

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
EINWIRKUNG CYTOSTATISCH WIRKSAMER SUBSTANZEN
AUF DIE MÄNNLICHEN KEIMDRÜSEN DER KRÖTE
(BUFO VULGARIS)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johannes Gutenberg-Universität

vorgelegt von
Ingo Reinemann
aus Dortmund

Mainz 1965

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
EINWIRKUNG CYTOSTATISCH WIRKSAMER SUBSTANZEN
AUF DIE MÄNNLICHEN KEIMDRÜSEN DER KRÖTE
(BUFO VULGARIS)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johannes Gutenberg-Universität

vorgelegt von
Ingo Reinemann
aus Dortmund

Mainz 1965

Dekan: Prof. Dr. Korting

Referent: Priv.-Doz. O. A. Dr. W. Humke

Korreferent: Dekan Prof. Dr. K. Thomsen



Meinen Eltern gewidmet

I EINLEITUNG

II METHODIK

1. Austesten der Prolaneinheiten
2. Applikationsschema der cytostatischen Substanzen
3. Bestimmung der Kriterien
 - A) LD₅₀ und tolerierte Einzeldosis
 - B) Beweglichkeit
 - C) Morphologie
 - D) Zahl

III ORIENTIERENDE VORVERSUCHE

Besprechung der Ergebnisse

- A) Beweglichkeit
- B) Morphologie
- C) Zahl

IV DIE ZUR ANWENDUNG GELANGTEN STATISTISCHEN METHODEN

V VERSUCHSREIHEN

A) ENDOXAN^(R) B) E39SOL^(R) C) TRENIMON^(R) D) VERSUCHSPRÄPARAT DG428

1. Chemismus und Wirkungsmechanismus
2. Bestimmung der LD₅₀ und der tolerierten Einzeldosis
3. Tabellen und statistische Auswertung der Ergebnisse

VI DISKUSSION DER ERGEBNISSE

1. Gegenüberstellung der einzelnen Cytostatica in ihrer Einwirkung auf die Spermatogenese
 - A) Morphologisch normale Spermien
 - B) Morphologisch veränderte Spermien
 - a) Nicht vollständig ausgereifte Spermien
 - b) Unreife Spermien
 - c) Spermien mit Anomalien und Defekten
 - C) Zahl
 - D) Beweglichkeit
2. Vergleich mit histo- und cytologischen Befunden anderer Autoren

VII ZUSAMMENFASSUNG

LITERATURVERZEICHNIS

EINLEITUNG

Das menschliche Keimgut ist seit der Entdeckung und Fortentwicklung kernphysikalischer Energien einer zunehmenden Gefährdung ausgesetzt. Die biologischen Auswirkungen energiereicher Strahlen sind daher Gegenstand umfangreicher medizinischer Forschungen geworden.

Seit den MENDELschen Vererbungsgesetzen wurde die Genetik durch zahlreiche Erkenntnisse bereichert. Speziell an den Chromosomen der Zelle lassen sich die mutagenen Wirkungen physikalischer und chemischer Noxen studieren. Damit hat die experimentelle Genetik durch den Beweis genau definierter mutagener Konsequenzen eine große praktische Bedeutung erlangt.

Die natürliche Exposition des Menschen gegenüber atomarer Energie ist durch die kosmische Strahlung gegeben. Einer ungleich höheren, jedoch kontrollierten Strahlendosis unterliegt der menschliche Organismus bei der Anwendung von Röntgen- und Radiumstrahlen zur Behandlung von Krebserkrankungen.

Mit der Entdeckung der "cytostatischen" Wirkung des Colchicins ist neben den physikalischen Einwirkungen erstmalig auch der Einfluß chemischer Noxen auf den Zellorganismus experimentell geprüft worden (31). Die Kenntnis über die Kerngifte, die seit LUDFORD (1936) als Mitosegifte bezeichnet werden, gehen auf Versuche des belgischen Pathologen A.P.DUSTIN zurück. DUSTIN fand Störungen des Mitoseablaufes nach Injektion einer großen Anzahl von chemischen Stoffen bei der Maus. Sein Schüler LITS beschrieb die "karioklastische" Wirkung des Colchicins. Alle chemischen Substanzen mit cytostatischen Eigenschaften lösen an der Zelle ähnliche biologische Effekte aus wie die ionisierenden Strahlen. Nach RÖHRBORN (49) gilt für die chemischen Verbindungen auch die Bezeichnung "Radiomimetica", wenn sie "cytostatisch, kanzerogen und mutagen wirken und Nukleinsäuren in vitro zu depolymerisieren vermögen".

Im einzelnen ist der biologischen Wirkung von energiereichen Strahlen und Cytostatica gemeinsam, daß sie in der Ruhephase der Zelle oder während der Mitose Schädigungen setzen, die die Zellteilung hemmen oder aber den Zellorganismus zerstören. Hiervon werden in

gleichem Maße gesunde, insbesondere schnell proliferierende Gewebe und auch Tumorzellen betroffen. Die Wirkungsrichtung von Cytostatika wird erheblich beeinflusst durch die Geschwindigkeit des Reaktionsablaufs: Eine schnelle und intensive Freisetzung der Wirkgruppen verringert die Richtungsselektivität, während eine verzögernd einsetzende Wirkung die lokale Giftung begünstigt und durch eine anhaltende Wirkungsdauer noch gesteigert wird. Bisher ist es nicht gelungen, selektiv, ohne gesunde Zellen zu schädigen, Strahlen und Cytostatica nur am Tumor wirksam werden zu lassen. Das Problem einer erfolgreichen Therapie besteht aber darin, ob es gelingt, eine für die Tumorzellen letale Dosis zu applizieren, ohne dem gesunden Organismus durch Nebenwirkungen zusätzlichen Schaden zuzufügen.

Da sich unter den Krebskranken auch Kinder (KÖTTGEN (25)) und Menschen im geschlechtsreifen Alter befinden, wird zwangsläufig auch eine Schädigung ihres Keimgutes mit in Kauf genommen werden müssen. Grundsätzlich sind genetische Schäden irreversibel. Alle Maßnahmen, um die Schäden zu verhüten, können nur prophylaktischer Natur sein. Über die Chemogenetik ist noch wenig bekannt.

Durch die Hemmung der verschiedenen Phasen der Mitose (HEILMEYER (15), LETTRE (28)) und der mutagenen Wirkung kommt es zu toxischen Begleiterscheinungen auf die sich besonders durch rege Proliferations-tätigkeit auszeichnenden Blutbildungsstätten und Keimdrüsen. Beim Manne zeigt sich je nach der applizierten Dosis ein breiter Spielraum zwischen der Sterilität in Form einer totalen Spermien-aplasie und einer kaum merklichen Einschränkung, wie es GOLDECK und HAGENAH (10) im histologischen Bild zeigen konnten. Diese Einschränkung kann allerdings nur im Tierexperiment an einem großen Material als herabgesetzte Fertilität erfaßt werden. Nach SPITZ (54) wurde bei mit N-Lost behandelten männlichen Patienten in 90% der Fälle post mortem eine Hodenatrophie festgestellt.

In den letzten zehn Jahren haben die Cytostatica zur Behandlung von Leukosen oder aber als Zusatztherapie neben Operation und Bestrahlung von Krebsherden z.B. im Bereich der Genitalorgane zunehmend Anwendung gefunden.

Zu den in der klinischen Therapie zur Zeit erprobten chemischen

Substanzen gehören:

1. Chloraethylenamin-Verbindungen (ENDOXAN^(R))
2. Aethylenimin-Verbindungen (Bayer E39 soluble, TRENIMON^(R))
3. Antimetabolite (Bayer DG428^(R))

Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, den cytostatischen Effekt dieser Substanzen auf die Spermiogenese der Kröte (*Bufo vulgaris*) unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen. Als Kriterien dienen die Morphologie, die Anzahl und die Beweglichkeit der in der Kloakenflüssigkeit vorhandenen Spermien. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe statistischer Methoden.

METHODIK

Die Kröten aller Versuchsserien wurden bei annähernd konstanter Temperatur von $+22^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Sie hatten Wasserbehälter zum Baden und wurden mit Mehlwürmern ernährt.

Verdünnungen der Cytostatica - Lösungen wurden mit krötenphysiologischer 0,6%iger NaCl - Lösung vorgenommen.

1. Austesten der Prolaneinheiten

Applikation:

In Anlehnung an den Schwangerschaftstest nach GALLI - MAININI (38) wurden jeweils einer Gruppe von 5 Kröten 10, 20, 30, 40 und 50 Einheiten Prolan^x in den dorsalen Lympfsack gespritzt. Der Einstich erfolgte am Oberschenkel. Die Nadel wurde dann subcutan bis zum dorsalen Lympfsack vorgeschoben. Die Länge des Stichkanals wirkt ähnlich einem Ventilverschluß, wodurch das Zurück - und Ausfließen der Injektionslösung verhindert wird.

Gewinnung und Auszählung der Spermien:

Die männliche Kröte ergießt den Samen in ihren Kloakenenddarm. Deshalb wurde zwei Stunden nach der Injektion mit einer modifizierten Augenpipette neunmal im Abstand von 1 Stunde Kloakeninhalt entnommen, um die Anzahl der Spermien pro cmm Kloakenflüssigkeit zu ermitteln. Die Technik des Krötentests hat W. NAUMANN (41) in seiner Dissertation dargelegt. Von den verschiedenen Auszählungsmethoden ist das Zählverfahren nach MARQUARDT (39) am besten geeignet. BERGNER (5) fand es bei einem Vergleich mit der Gesichtsfeldauszählung von BELONOSCHKIN (4) als das weitaus genauere: Spermien enthaltende Kloakenflüssigkeit wird in einer Leukopipette bis zur Marke 0,5 aufgezogen und bis zur nächsten Markierung mit 0,85%iger NaCl - Lösung mit 2 Tropfen 96%igem Alkohol verdünnt. Während BERGNER zur Spermienauszählung die Thoma - Kammer benutzte, zählen wir wegen der größeren Genauigkeit die vier großen Eckquadrate der Neubauer - Kammer im Dunkelfeld aus. Die Anzahl der Spermien wurde mit 25 multipliziert.

Ergebnis:

Die Zahl der zwischen der 2. und 5. Stunde nach der Applikation in

^x(Chorioman der Firma H. Mack Nachf., Illertissen/Bayern)

Kloakeninhalt vorhandenen Spermien war nach unserer Beobachtung in dem Dosisbereich kaum unterschiedlich. Wir haben deshalb bei allen weiteren Versuchen pro Tier 30 E. Chorioman verabfolgt.

2. Applikationsschema der cytotostatischen Substanzen

Vor der Applikation des Cytostatikums wurde bei 70 Kröten in Gruppen zu 4x15 und 1x10 Tieren innerhalb eines Tages die Spermatorrhoe ausgelöst, um bei der späteren Auswertung nur die Spermien zu er-

APPLIKATIONSSSCHEMA

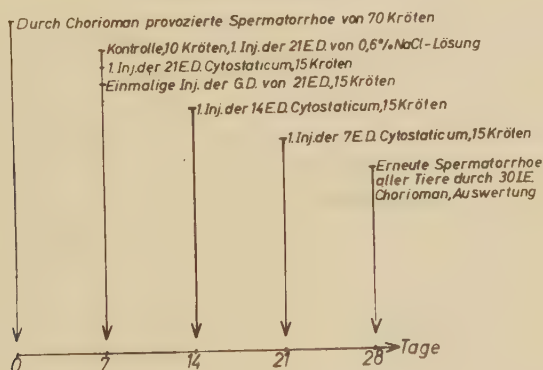


Abb.1

fassen, die sich während der Applikationsdauer im Teilungs- und Reifungsstadium befunden haben.

Wir unterscheiden bei der Zellteilung zwei Teilungsvorgänge: Die Kernteilung oder Karyokinese und die Plasmateilung oder Plasmadiärese. Beide sind eng miteinander verbunden. Die Zellteilung läßt sich morphologisch in zeitlich aufeinanderfolgende Teilprozesse gliedern: Die Prophase mit Spirem- und Monasterstadium, in dem die Äquatorialplatte gebildet wird, gefolgt von der Metaphase mit der Anordnung der Chromosomen zur Diasterbildung und der Anaphase mit dem Diaster- und Dispiremstadium. Danach folgt die Telophase. Sie endet mit der Membranbildung und Durchteilung des Zelleibes. Bei der Reduktionsteilung der Keimzellen tritt in der Metaphase keine Längsspaltung der Chromosomen ein, sondern diese werden je zur Hälfte auf die beiden Tochterkerne verteilt. Mit dem Spermatidstadium, ausgehend von der Spermatogonie über den Spermatocyten 1. und 2. Ordnung, hört die Zellteilung der männlichen Keimzelle auf. Die haploiden Spermatiden reifen jetzt durch die Ausbildung des Mittelstückes, des Schwanzes und durch das Abstoßen des Cytoplasmas zum Spermium aus.

Für die ersten 15 Tiere begann sieben Tage nach der Spermatorrhoe eine dreiwöchige Behandlung mit einer täglichen Injektion des Cyto-

statikums. Die zweite Gruppe bekam als einmalige Injektion die Gesamtdosis (GD) von 21 Einzeldosen (ED) des Cytostatikums. Für die dritte Gruppe begann 14 Tage nach der Spermienausschüttung eine zweiwöchige tägliche Injektion und für die vierte Gruppe drei Wochen nach der Prolangabe eine siebentägige Applikation. Die Gruppe von zehn Kröten, täglich mit physiologischer Kochsalzlösung gespritzt, lief als Kontrolle. Vier Wochen nach der ersten Hormoninjektion wurden die Kröten wieder mit 30 E.Prolan zur Spermatorrhoe gebracht.

3. Bestimmung der Kriterien

A) LD₅₀ und tolerierte Einzeldosis

Durch Applikation abfallender Dosen eines Cytostatikums bestimmten wir an 5 Gruppen zu je 10 Kröten die LD₅₀. Siebzig Kröten von annähernd gleichem Gewicht wurden gewogen, um ihr Durchschnittsgewicht zu ermitteln. Die Einzeldosis des Cytostatikums pro kg Mensch rechneten wir auf das Durchschnittsgewicht der Kröten um und erhielten somit die Einzeldosis (ED) pro g Kröte.

B) Beweglichkeit

Von der dritten Entnahme, vier Stunden nach der Prolaninjektion, wurde sofort von 100 Spermien der Prozentsatz der Beweglichkeit im Dunkelfeld auf einem Objektträger ausgezählt. Als beweglich galten die Spermien, die sich vom Ort fortbewegten oder auf der Stelle, ohne sich fortzubewegen, rudernde Bewegungen des Schwanzes ausführten. Im Dunkelfeld ließ sich der sonst kaum sichtbare Schwanz darstellen. Auf diese Weise konnte sein Bewegungszustand beurteilt werden. Vereinzelt konnten sich auch die schwanzlosen Spermatiden durch einen pseudopodienähnlichen Plasmafluß fortbewegen.

C) Morphologie

Die Beurteilung der Morphologie erfolgte erst, nachdem die Spermien etwa 20 Minuten nach Entnahme des Kloakeninhaltes unbeweglich geworden waren. Die Spermien und deren Vorstufen wurden mit einem Deckgläschen überdeckt. Wir klassifizierten 200 Spermien im Phasenkontrast nach ihrem morphologischen Erscheinungsbild und zwar in vier Hauptkriterien mit insgesamt 10 Unterteilungen:

1. Ausgereifte Spermien:

- a) Spermien ohne oder mit nur schwachem Plasmasaum des Kopfes
- b) Involutionsformen

2. Nicht vollständig ausgereifte Spermien:

- a) Spermien mit mittelstarkem Plasma von der Länge eines Drittels der Kopflänge, meist am hinteren Kopffende
- b) Spermien mit starkem Plasmasaum von der Länge einer Hälfte der Kopflänge
- c) Spermien mit Plasmotropfen am Schwanz

3. Unreife Spermien:

- a) Spermien mit starkem Plasmasaum über der ganzen Kopflänge verteilt
- b) Spermien in Übergangsformen von a) nach c), eingerollter Kopf
- c) Spermien wie unter a), aber ohne Schwanz
- d) Spermien mit Kerndefekten, Verklumpungen mehrerer Kerne

D) Zahl

Von der zweiten bis fünften Stunde nach der Injektion entnehmen wir stündlich in der oben angegebenen Weise den Kloakeninhalt und bestimmten die Zahl der Spermien pro cmm Kloakenflüssigkeit. Bei den Angaben über die Zahl der Spermien pro cmm handelt es sich nicht um absolute Werte, da die Spermien enthaltende Samenflüssigkeit durch die unterschiedlichen Mengen des wässrigen Kloakeninhaltes verunreinigt und der gesamte Kloakeninhalt im Verlaufe mehrerer Stunden nicht erfaßt wurde. Gezählt wurden die Keimzellen, die in der oben angegebenen Weise morphologisch definiert wurden. Die Zahlen, die zum nachfolgenden Vergleich herangezogen werden, setzen sich aus den Werten zusammen, die wir in vier aufeinanderfolgenden Stunden ermittelten. Die zur Anwendung gelangte Auszählungsmethode ist schon bei der Bestimmung der Prolaneinheiten dargelegt worden.

ORIENTIERENDE VORVERSUCHE

Zur Orientierung über Morphologie, Zahl und Beweglichkeit untersuchten wir die Spermien von 20 bzw. 30 und 40 Kröten, bei denen keine Spermatorrhoe provoziert worden war (siehe Tab. Seite 10, 12 und 13).

Da wir die Versuchsdauer zur Toxizitätsprüfung auf 4 Wochen festlegten und die Kröten vor Behandlungsbeginn zur Spermatorrhoe brachten, mußte geprüft werden, ob die Spermien innerhalb von 4 Wochen ausreifen. Es sei der Besprechung der Ergebnisse vorweggenommen, daß wir bei den Kröten nach vierwöchiger Ruhepause ein normales Spermogramm fanden (siehe Tab. Seite 11, 12 und 13). Ein bedeutender Unterschied zu dem Spermogramm der 4 Monate lang in Ruhe befindlichen Kröten fand sich nicht. Nach MANSTEIN und SCHMIDT-HOENSDORF (38) können die Kröten für den Schwangerschaftstest schon wieder nach vierzehntägiger Ruhepause benutzt werden.

Besprechung der Ergebnisse:

A) Beweglichkeit

Nach 20 Minuten waren über 90% der Spermien unbeweglich. Die Beweglichkeit der Spermien 10 Minuten nach der Entnahme liegt im Mittel bei 52,5 bzw. 56,1% je nach Intervalllänge und zeigt von Kröte zu Kröte erhebliche Unterschiede. Ein Zusammenhang zwischen Wasserstoffionenkonzentration und Beweglichkeit ist nach der Regressionsrechnung nachweisbar ($p < 0,0027$).

B) Morphologie

Legt man dem Ergebnis der Morphologie die Einteilung für menschliche Spermien nach WILLIAMS (57) zugrunde, so entsprechen die ausgereiften Spermien der Kröte unter physiologischen Bedingungen mit 72,3% bzw. 67,9% je nach Intervalllänge den nicht pathologischen Keimzellen. Die übrigen 27,7% bzw. 32,1% der morphologisch veränderten Spermien entsprechen den pathologischen Formen. Damit liegen unter morphologischen Gesichtspunkten nach der Definition von JOEL (20) diese Durchschnittsprozentszahlen an der unteren Grenze der menschlichen Normospermie. Da der Ausreifungsvorgang der menschlichen Spermien und der der Kröte im Prinzip übereinstimmt, haben

wir die Einteilung nach WILLIAMS auch für Krötenspermien übernommen.

An den pathologischen Formen haben die unreifen Spermien einen Anteil von 3,8 bzw. 4,1%. An diesen Prozentzahlen sind die Spermatidformen, die als Spermien ohne Schwanz erscheinen, mit 0,6 bzw. 0,8% beteiligt. Spermien mit mehreren Schwänzen finden wir bei 0,4 bzw. 0,3% und Kerndefekte sowie Kernverklumpungen bei 2,8 bzw. 4,4%. Die nicht vollständig ausgereiften Spermien liegen an der Grenze zwischen pathologischen und nicht pathologischen Formen. Sie werden aber nach JOEL zu den pathologischen Keimzellen des Ejakulates gezählt.

C) Zahl

Die Zahl der Spermien pro cmm Kloakenflüssigkeit liegt bei 2,3,4 und 5 Stunden nach der Prolaninjektion zwischen Null und Zweitausend. Die Mittelwerte der Stichprobensummen betragen 1127 bzw. 943 Spermien pro cmm. Durchschnittlich produzierten die Kröten innerhalb von 5 Stunden 4 ml Kloakenflüssigkeit. Darauf bezogen wurden mit einem Samenerguß rund 4 Millionen Spermien freigesetzt. Kröten, die keine Spermien im Exkret zeigten, wurden in der Tabelle nicht aufgeführt.

Auswertung der BEWEGLICHKEIT der Spermien von 40 Kröten ohne
cytostatische Behandlung. Spermatorrhoe nach 30 E.Chorioman.

lfd.Nr.	Prozent	Mittelwert	pH-Wert
1	3		5
2	23		5
3	45		5
4	13		5
5	15	35,6	5
6	33		5
7	68		5
8	43		5
9	31		5
10	50		5
11	68		5
12	72		5,5
13	51		5,5
14	15		5,5
15	27	49,0	5,5
16	59		5,5
17	99		5,5
18	20		5,5
19	70		6
20	40		6
21	3		6
22	77		6
23	51		6
24	90		6
25	48		6
26	89		6
27	55		6
28	77	60,9	6
29	43		6
30	33		6
31	52		6
32	93		6
33	72		6
34	50		6
35	95		6
36	45		6
37	74		6
38	72		7
39	63	70,0	7
40	75		7
Mittelwert	52,5		5,7

Auswertung der BEWEGLICHKEIT der Spermien von 9 Kröten ohne
cytostatische Behandlung nach 4wöchiger Regenerationszeit.
Spermatorrhoe nach 30 E.Chorioman.

lfd.Nr.	Prozent
1	65
2	80
3	33
4	77
5	60
6	48
7	47
8	35
9	60
Mittelwert	56,1

MORPHOLOGIE

Auswertung von 20 Kröten ohne cytostatische Behandlung. Spermatorrhoe nach 30 E.Chorioman. Prozentsatz von je 200 Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>				
Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involutions-formen	Summe	Mittel-starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	<u>Spermien</u> Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz	Summe	
lfd.Nr.							
1	64,0	5,0	69,0	20,0	1,5	0,0	21,5
2	74,0	3,5	77,5	17,0	3,5	0,0	20,5
3	75,0	7,0	82,0	12,5	1,5	0,0	14,0
4	56,5	1,5	58,0	28,0	4,5	2,5	35,0
5	45,5	0,0	45,5	39,0	3,0	6,0	48,0
6	71,5	2,0	73,5	4,0	1,0	7,0	12,0
7	66,0	1,0	67,0	21,5	1,0	2,0	24,5
8	75,5	4,0	79,5	9,0	2,0	2,5	13,5
9	87,0	2,0	89,0	5,0	1,0	0,5	6,5
10	66,0	2,0	68,0	21,0	1,0	2,5	24,5
11	72,5	1,0	73,5	12,0	2,5	2,0	16,5
12	69,0	0,5	69,5	16,0	2,5	2,5	21,0
13	91,0	3,0	94,0	0,0	0,0	2,0	2,0
14	94,5	0,5	95,0	0,5	0,0	0,0	0,5
15	61,0	0,0	61,0	26,0	1,5	2,5	30,0
16	69,0	0,0	69,0	23,0	1,0	4,0	28,0
17	66,0	2,0	68,0	23,5	0,5	3,0	27,0
18	64,5	0,5	65,0	21,0	1,0	2,5	24,5
19	66,5	1,0	67,5	20,5	3,0	4,0	27,5
20	73,5	1,5	75,0	12,5	2,0	2,5	17,0
Mw.:	70,4	1,9	72,3	16,6	1,7	2,4	20,7

<u>Unreife Spermien</u>				<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>			
Starker Plasma- saum des Kopfes ganzen Kopfes	Einge- rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufgetrie- bener kur- zer Kopf	Summe	
lfd.Nr.							
1 2,5	2,0	1,0	5,5	0,5	3,5	4,0	
2 1,0	0,5	0,0	1,5	0,0	0,5	0,5	
3 1,5	2,0	0,0	3,5	0,0	0,5	0,5	
4 2,0	2,5	0,5	5,0	0,0	2,0	2,0	
5 1,5	2,5	0,0	4,0	1,5	1,0	2,5	
6 4,5	2,5	0,0	7,0	0,5	7,0	7,5	
7 2,0	2,5	1,0	5,5	0,0	3,0	3,0	
8 0,5	1,0	0,0	1,5	0,5	5,0	5,5	
9 1,0	0,0	0,0	1,0	1,0	2,5	3,5	
10 0,5	2,0	0,5	3,0	0,5	4,0	4,5	
11 1,5	3,0	1,5	6,0	1,5	2,5	6,5	
12 1,0	1,0	1,0	3,0	1,0	5,5	6,5	
13 0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	3,5	4,0	
14 4,5	2,0	0,5	7,0	0,0	2,0	2,0	
15 0,0	1,0	0,0	1,0	1,0	2,5	3,5	
16 0,5	1,5	1,0	3,0	0,0	0,0	0,0	
17 0,5	1,5	1,5	3,5	0,0	1,5	1,5	
18 1,5	4,0	0,0	5,5	0,0	5,0	5,0	
19 2,0	1,5	0,5	4,0	0,0	1,0	1,0	
20 2,0	0,5	2,0	4,5	0,0	3,5	3,5	
Mw.:	1,5	1,7	0,6	3,8	0,4	2,8	3,2

MORPHOLOGIE

Auswertung der Spermien von 8 Kröten ohne cytotatische Behandlung nach 4wöchiger Regenerationszeit. Spermatorrhoe nach 30 E. Chorioman. Prozentsatz von je 200 Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
				<u>Spermien</u>		
Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involutionsformen	Summe	Mittel-starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz	Summe
lfd.Nr.						
1	67,0	3,5	70,5	17,0	3,0	24,5
2	71,5	2,5	74,0	11,5	0,0	16,5
3	73,0	5,0	78,0	8,0	0,5	11,5
4	71,5	2,5	74,0	14,5	1,5	20,0
5	65,5	3,5	69,0	15,5	0,5	20,5
6	49,5	2,0	51,5	19,0	11,5	35,0
7	57,5	2,0	59,5	24,0	5,5	32,0
8	64,5	2,5	67,0	22,0	3,0	26,0
Mw.:	65,0	2,9	67,9	16,4	3,2	23,2

<u>Unreife Spermien</u>			<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>			
Starker Plasma-saum des ganzen Kopfes	Einge-rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufgetriebener kurzer Kopf	Summe
lfd.Nr.						
1	1,0	2,0	0,5	3,5	0,0	1,5
2	1,0	2,0	1,0	4,0	0,0	5,5
3	0,5	2,0	0,0	2,5	1,0	7,0
4	1,5	2,0	0,0	3,5	0,0	2,5
5	1,0	2,5	1,0	4,5	1,0	5,0
6	2,0	4,0	1,5	7,5	0,0	6,0
7	0,5	1,0	1,5	3,0	0,5	5,0
8	1,5	2,0	1,0	4,5	0,0	2,5
Mw.:	1,2	2,1	0,8	4,1	0,3	4,4

ZAHL der Spermien pro cmm von 30 Kröten ohne cytotostatische Behandlung. Spermatorrhoe nach 30 E.Chorioman.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	225	250	50	0	525
2	0	0	75	100	175
3	600	75	0	0	675
4	0	25	0	100	125
5	675	875	450	225	2225
6	75	325	500	250	1150
7	0	100	150	50	300
8	0	0	0	100	100
9	0	0	525	575	1100
10	275	525	300	1850	2950
11	75	875	1600	1000	3550
12	0	150	375	450	975
13	0	0	175	175	350
14	0	250	400	1875	2525
15	0	100	100	125	325
16	0	150	350	450	950
17	200	700	1125	1125	3150
18	0	50	25	150	225
19	0	525	900	1200	2625
20	0	175	200	800	1175
21	100	300	125	175	700
22	0	50	125	75	250
23	150	1225	350	225	1950
24	25	100	525	200	850
25	125	725	100	375	1325
26	525	200	75	0	800
27	0	0	0	125	125
28	0	0	0	100	100
29	0	0	150	225	375
30	250	625	725	575	2175
Mittelwert	110,0	279,2	315,6	422,5	1127,5

ZAHL der Spermien pro cmm von 9 Kröten ohne cytotostatische Behandlung nach 4wöchiger Regenerationszeit. Spermatorrhoe nach 30 E.Chorioman.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	75	250	250	0	570
2	0	150	425	100	675
3	250	250	75	0	575
4	125	125	750	300	1300
5	0	25	375	100	500
6	175	650	550	250	1625
7	325	250	275	450	1300
8	200	250	425	150	1025
9	75	425	375	50	925
Mittelwert	125,0	263,9	388,9	155,5	943,9

DIE ZUR ANWENDUNG GELANGTEN STATISTISCHEN METHODEN

Die Diagnose einer Krankheit wird im allgemeinen auf Grund ihrer gesetzmäßigen oder wenigstens regelhaften Symptome gestellt. Gesetzmäßigkeiten und Regeln werden aber nicht aus der Einzelbeobachtung hergeleitet, sondern aus der Massenbeobachtung, die auch die Grundlage der Statistik bildet (Koller 24). Die Statistik hat es sich unter anderem zur Aufgabe gemacht, aus den Beobachtungen der medizinischen Forschung verallgemeinerungsfähige Kenntnisse zu ziehen.

Die Cytostatica ENDOXAN^(R), TRENIMON^(R), Bayer E39 sol.^(R) und Bayer DG428^(R) wurden in jeweils vier verschiedenen Dosierungen an Kröten getestet. Nebenher liefen Kontrollgruppen. Jede Kröte wurde nur einmal verwandt. Die Werte der Morphologie und Beweglichkeit werden in Prozentzahlen angegeben. Es interessiert uns, ob einmal die gefundenen Unterschiede zwischen den Dosen und weiter zwischen den Medikamenten Zufallseffekte darstellen oder signifikant, d.h. gesichert sind.

Zur Beurteilung von Versuchsergebnissen ist eine ganze Reihe statistischer Methoden entwickelt worden, die unter verschiedenen Fragestellungen angewandt werden können. Fast alle Methoden bauen jedoch auf einem Ansatz auf, der sog. "Nullhypothese". Diese Hypothese besagt: Es wird angenommen, daß zwischen den Versuchsergebnissen kein Unterschied besteht.

Durch den angewandten statistischen Test wird dann berechnet, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, daß die beobachteten und noch stärker sich unterscheidenden Werte bei Zutreffen der Nullhypothese zu erwarten sind.

Je nach Größe der berechneten Wahrscheinlichkeit P werden die entsprechenden Schlußfolgerungen gezogen. Ist P sehr klein ($P < 0,01$), dann bedeutet es, daß bei Zutreffen der Nullhypothese diese Werte durch zufällige Auswahl nur selten zu erwarten sind. Es ist deshalb der Schluß berechtigt, daß die Nullhypothese nicht zutrifft, d.h., es ist anzunehmen, daß zwischen den Versuchsreihen Unter-

schiede bestehen. Die Nullhypothese wird abgelehnt und das Ergebnis als signifikant bezeichnet. Die Wahrscheinlichkeit P wird damit zur sog. Irrtumswahrscheinlichkeit, denn $P = 0,01$ bedeutet, daß in 1% bei zufälliger Auswahl die beobachteten Werte erwartet werden können, so daß bei dieser Reihe die Schlußfolgerung, "das Ergebnis ist signifikant", falsch wäre. Liegt P zwischen 5 und 1%, dann könnte einerseits die Nullhypothese bereits abgelehnt werden, andererseits ist die Bezeichnung "signifikant" mit einer relativ hohen Unsicherheit behaftet. In diesem Bereich wird deshalb das Ergebnis lediglich als "auffällig" bezeichnet.

Ist $P > 0,05$, dann sind die beobachteten Werte bei Zufallsauswahl relativ häufig zu erwarten, die Nullhypothese kann deshalb kaum abgelehnt werden. Damit ist aber noch nicht gesagt, daß zwischen den Versuchsergebnissen keine Unterschiede vorliegen müssen. Diese können lediglich so klein sein, daß sie sich bei der angewandten Methode nicht nachweisen lassen. Die Schlußfolgerung ist deshalb nur: "Ein Unterschied läßt sich nicht nachweisen."

Die Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05....0,01....und 0,001 wird mit ...^x,...^{xx} und...^{xxx} symbolisiert(52).

Um die Unterschiede zwischen den Medikamenten und Dosen im Ausmaß ihrer Einwirkung auf die Spermatogenese als signifikant bezeichnen zu können, schließen wir zur statistischen Auswertung die Varianzanalyse an. Die Berechnung ist einfacher wenn die Anzahl der Einzelwerte in den Tabellen gleich ist. Wir berücksichtigen die Werte der lfd.Nr.1-7, die vorher ohne Auswahl aneinandergereiht waren. Die Versuchswerte müssen bei allen Gruppen unter vergleichbaren Bedingungen gewonnen werden. Es wird deshalb geprüft, ob die gleichzeitig durchgeführten Kontrollversuche keine Unterschiede zeigen.

Angewandte Verfahren

1. Varianzanalyse

Das Verfahren der Varianzanalyse wurde von R.A.Fisher entwickelt. Die Varianzanalyse prüft den Unterschied zwischen den Mittelwerten mehrerer Gruppen. Die Varianz (S^2) ist das Quadrat der Standardab-

weichung und errechnet sich nach folgender Formel:

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} ; \sum (x_i - \bar{x})^2 = \text{Summe der Quadrate der Einzelabweichung vom Mittelwert (SAQ)}$$

Werden mehrere Gruppen betrachtet, kann die Varianz zerlegt werden in die Abweichung der Einzelwerte vom Gruppenmittelwert und die Abweichung der Gruppenmittelwerte vom Gesamtmittelwert.

$$\begin{aligned} (n-1) \cdot s^2 &= \sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x})^2 = \sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x}_j + \bar{x}_j - \bar{x})^2 = \sum_{ij} ((x_{ij} - \bar{x}_j) + (\bar{x}_j - \bar{x}))^2 \\ &= \sum_{ij} ((x_{ij} - \bar{x}_j)^2 + 2(x_{ij} - \bar{x}_j)(\bar{x}_j - \bar{x}) + (\bar{x}_j - \bar{x})^2) \\ &= \sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 + 2 \sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x}_j)(\bar{x}_j - \bar{x}) + \sum_{ij} (\bar{x}_j - \bar{x})^2 \end{aligned}$$

Da die Summe der Einzelabweichung $(x_{ij} - \bar{x}_j) = 0$ ist, ergibt sich für

$$(n-1) \cdot s^2 = \sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 + \sum_{ij} (\bar{x}_j - \bar{x})^2$$

Der erste Summand ergibt die Summe der Quadrate der Einzelabweichungen vom Gruppenmittelwert (SAQ innerhalb der Gruppen), der zweite Summand die Abweichungsquadrate der Gruppenmittelwerte vom Gesamtmittel (SAQ zwischen den Gruppen).

Aus der Summe der Abweichungsquadrate wird das mittlere Abweichungsquadrat errechnet (MAQ). Die Varianzanalyse prüft, ob das mittlere Abweichungsquadrat zwischen den Gruppenmittelwerten größer ist, als MAQ innerhalb der Gruppen. Der Quotient wird mit den Werten der F-Verteilung verglichen.

Voraussetzung für die Anwendung der Varianzanalyse

Die Varianzen innerhalb der Gruppen dürfen keine signifikanten Unterschiede zeigen, da sonst der MAQ innerhalb der Gruppen kein brauchbares Prüfmaß ergibt.

Mit dem Bartlett-Test kann geprüft werden, ob diese Voraussetzung gegeben ist.

Bartlett-Test

Nach Bartlett ist der nachfolgende Ausdruck annähernd verteilt wie χ^2 .

$$\chi^2 = f \times \ln s^2 - \sum_{i=1}^l f_i \times \ln s_i^2$$

l = Anzahl der Gruppen (Spalten)

f = Summe der Freiheitsgrade aller Gruppen

s^2 = mittlere Varianz

f_i = Freiheitsgrad in der i -ten Gruppe

s_i^2 = Varianz innerhalb der i -ten Gruppe

Sind die Freiheitsgrade innerhalb der einzelnen Gruppen gleich, ($f_1=f_2=f_3=f_4=f_5$) vereinfacht sich die Formel

$$\chi_o^2 = f \times (\ln s^2 - \frac{1}{l} \sum_{i=1}^l \ln s_i^2)$$

Für die Berechnung ist die Verwendung dekadischer Logarithmen vorteilhaft. Darum lautet die entsprechende Formel:

$$\chi_o^2 = 2,3026 \times f (\lg s^2 - \frac{1}{l} \sum_{i=1}^l \lg s_i^2)$$

2,3026 = $\ln 10$ (Faktor für die Umrechnung natürlicher in dekadische Logarithmen)

Der Bartlett-Test ergab, daß bei allen Kriterien außer den "unreifen Spermien" die Varianzanalyse zur Anwendung gebracht werden konnte. Für das Kriterium der "unreifen Spermien" wurden der Test nach Kruskal-Wallis und für die Abstufung der Dosierungen der Wilcoxon-Test angewandt.

Beispiel einer einfachen Varianzanalyse

Erläuterung der Begriffe:

SAQ = Summe aller Abweichungsquadrate

MAQ = mittleres Abweichungsquadrat MAQ = SAQ/f (entspricht Varianz)

f = Freiheitsgrad, d.h. Zahl der unabhängigen Werte

F = Prüfwert, der angibt, um welchen Faktor die untersuchte Varianz größer ist als die Restvarianz. Der F -Wert wird an Hand der theoretischen F -Verteilung beurteilt; die Größe des F -Wertes ist ab-

hängig von der Anzahl der Freiheitsgrade im Zähler und im Nenner.

ENDOXAN (Ausgereifte Spermien)

	GD	21ED	14ED	7ED	Kontr.	Quersum.
$\sum_{i=1}^7 x = x_j$	363,0	261,0	340,5	324,0	524,5	$x=1813,0$
$\sum_{i=1}^7 x^2$	20862,0	10603,0	18792,8	16044,5	39923,8	106226,1
$\sum_{k=7} x_i^2$	18824,1	9731,6	16562,9	14996,6	39300,0	99415,2
Varianz			SAQ	f	MAQ	F
$S_1=99415,2-93913,4=$			5501,8	4	1375,5	$6,6 > F_{0,001}$
(Rest) $S_2=106226,1-99415,2=6810,9$				30	227,0	
Gesamt	106226,1-93913,4=		12312,7	34		

2. Mehrfache Varianzanalyse

Sind die Versuchsergebnisse unter mehreren Einflußfaktoren beobachtet worden, so kann bei geeigneter Versuchsanordnung die Zerlegung nach diesen Faktoren erfolgen. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurden die Ergebnisse nach Applikation und Medikament geordnet. Für jedes Medikament und jede Dosis wurden mehrere Tiere getestet. Diese wurden als Wiederholungen eines Versuches aufgefaßt. Zur Anwendung kam deshalb die doppelte Varianzanalyse mit Wiederholungen. Diese gestattet folgende Zerlegung:

	FG
1. Zwischen den Medikamenten	1-1
2. Zwischen Applikationen	k-1
3. Wechselwirkung	$(k-1)(1-1)$
4. Reststreuung	kl $(r-1)$

Gesamtvarianz	n-1
---------------	-----

Die Wechselwirkung gestattet eine Aussage über die gegenseitige Beeinflussung beider Faktoren. Ist z.B. die Reihenfolge der Wirkung der Applikationsarten bei den einzelnen Medikamenten unterschiedlich, dann besteht eine Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren, die sich bei der Auswertung nachweisen läßt.

Beispiel einer doppelten Varianzanalyse

Vergleich von Cytostaticis (Spermien mit Anomalien und Defekten)

	$\sum_{i=1}^7 x_{iGD}$	$\sum_{i=1}^7 x_{i21ED}$	$\sum_{i=1}^7 x_{i14ED}$	$\sum_{i=1}^7 x_{i7ED}$	$\sum_{j=1}^7 x_{ij} = X_j$	$\sum_{j=1}^7 x_{ij}^2$	X_i^2
E 39sol.	27,5	26,5	28,5	37,0	119,5	3639,8	3570,1
ENDOXAN	23,5	59,0	46,5	35,0	164,0	7420,5	6724,0
TRENIMON	33,0	91,5	47,0	39,0	210,5	13292,3	11077,6

$$\sum_i x_j = X_j \quad 84,0 \quad 177,0 \quad 122,0 \quad 111,0 \quad X=494,0$$

$$\sum_i x_{ij}^2 \quad 2397,5 \quad 12555,5 \quad 5183,5 \quad 4115,0 \quad \frac{\sum_{i,j} x_{ij}^2}{7} = 3464,5$$

$$\frac{X_j^2}{7} \quad 2352,0 \quad 10443,0 \quad 4961,3 \quad 4107,0 \quad \frac{\sum_j X_j^2}{7} = 3123,3$$

$$\sum_{i=1}^{84} x_{ij}^2 = 4176,7 \quad \frac{\sum_j X_j^2}{7} = 3053,1 \quad \frac{X^2}{n=84} = 2905,1$$

1 Zwischen den Medikamenten	SAQ	1	MAQ	F	
3053,1 - 2905,1	= 148,0	2	74,0	7,5	$F_{0,001}$
2 Zwischen den Dosen					
31.23,3 - 2905,1	= 218,2	3	72,7	7,3	$F_{0,001}$
3 Wechselwirkung					
SAQ ₄₋₂₋₁	= 193,2	6	32,2	3,3	$F_{0,01}$
4 Zwischensumme					
3464,5 - 2905,1	= 559,4	11	50,8		
5 Versuchsstreuung					
SAQ ₆₋₄	= 712,2	72	9,9		
6 Gesamtstreuung					
4176,7 - 2905,1	= 1271,6	83			

3. Orthogonale Vergleiche

Von Interesse ist nun noch ein Vergleich zwischen den Dosierungen als auch zwischen den Medikamenten mit der Fragestellung, welche Rangordnung den einzelnen Dosierungen und Cytostaticis zukommt.

Denn der gesicherte Unterschied zwischen den Medikamenten und Dosierungen läßt keine Schlüsse darüber zu, welche Medikamente und Dosierungen sich im einzelnen unterscheiden. Eine Rangordnung ist aber nur zu erwarten, wenn der Unterschied in der Varianzanalyse gesichert ist. Durch Zerlegung der Summe der Abweichungsquadrate (SAQ) in sog. orthogonale Vergleiche kann geprüft werden, welche Unterschiede signifikant sind. Prüfmaß ist auch hierbei der Quotient $F = \text{Varianz des Vergleichs} / \text{Restvarianz}$ bei einem Freiheitsgrad im Zähler und dem Freiheitsgrad der Restvarianz im Nenner.

Beispiel eines orthogonalen Vergleiches bei 3 Variablen

Vergleich von Cytostaticis (Spermien mit Anomalien und Defekten)

Vergleich	(SAQ) Abweichungsquadrat	f	MAQ	F
$(X_1 - X_2)$	$\frac{1}{2K}(X_1 - X_2)^2$	1	35,4	$F_{0,05}^{3,5}$
$(X_1 + X_2 - 2X_3)$	$\frac{1}{6K}(X_1 + X_2 - 2X_3)^2$	1	112,5	
$(X_2 - X_3)$	$\frac{1}{2K}(X_2 - X_3)^2$	1	38,6	$F_{0,05}^{3,8}$
$(X_2 + X_3 - 2X_1)$	$\frac{1}{6K}(X_2 + X_3 - 2X_1)^2$	1	109,3	
$(X_1 - X_3)$	$\frac{1}{2K}(X_1 - X_3)^2$	1	147,8	14,9
$(X_1 + X_2 - 2X_2)$	$\frac{1}{6K}(X_1 + X_2 - 2X_2)^2$	1	0,2	$F_{0,00}$
Summe		2	148,0	
Restvarianz		72	9,9	

$$X_1 = 119,5 \quad X_2 = 164,0 \quad X_3 = 210,5 \quad K = 28$$

Beispiel eines orthogonalen Vergleiches bei 5 Variablen

Vergleich der Dosen (Ausgereifte Spermien)

Vergleich	(SAQ) Abweichungsquadrat	f	MAQ	F
$(X_1 - X_2)$	$\frac{1}{2K}(X_1 - X_2)^2$			
	$\frac{1}{14}(363,0 - 261,0)^2$	1	743,1	$F_{0,05}^{3,2}$
$(X_3 - X_4)$	$\frac{1}{2K}(X_3 - X_4)^2$			
	$\frac{1}{14}(340,5 - 324,0)^2$	1	19,4	$F_{0,05}^{0,0}$
$(X_1 + X_2 - X_3 - X_4)$	$\frac{1}{4K}(X_1 + X_2 - X_3 - X_4)^2$			
	$\frac{1}{28}(363,0 + 261,0 - 340,5 - 324,0)^2$	1	58,6	
$(X_1 + X_2 + X_3 + X_4 - 4X_5)$	$\frac{1}{20K}(X_1 + X_2 + X_3 + X_4 - 4X_5)^2$			
	$\frac{1}{140}(363,0 + 261,0 + 340,5 + 324,0 - 2098)^2$	1	4680,6	
Summe		4	5501,8	
Rest		30	227,0	

$$X_{1 \text{ bis } 5} = \sum_{i=1}^7$$

K=7 (Anzahl der Reihen)

4. Kruskal-Wallis und Wilcoxon-Test

Sind die Voraussetzungen für die Anwendung der Varianzanalyse nicht gegeben, können parameterfreie Verfahren angewandt werden, die unabhängig von den Voraussetzungen der Varianzanalyse sind. Bei diesen Verfahren werden die beobachteten Werte entsprechend ihrer Größenordnung mit Rangzahlen belegt. Der kleinste Wert erhält die Nummer 1, der größte die Rangzahl n . Sind mehrere Beobachtungswerte gleich, werden die zugehörigen Rangzahlen addiert und durch die Anzahl der übereinstimmenden Werte geteilt. Jeder dieser Werte bekommt dann diese durchschnittliche Rangzahl.

Beispiel Wilcoxon-Test

ENDOXAN (Unreife Spermien)

Kontr.	Rz.	GD	Rz.	Rangsumme bei Vergleich von zwei Werten	
1,5	3	9,0	10		
3,0	4	12,5	11	$R_1=69$	$R_2=38$ bei $p_{0,05}$
4,0	6,5	8,0	9		
0,5	1	17,0	13	$R_1=73$	$R_2=32$ bei $p_{0,01}$
6,0	8	14,0	12		
3,0	5	21,0	14		
1,0	2	4,0	6,5		
$R_1=29,5$			$R_2=75,5$		

$$C > F_{0,01}$$

Die Gesamtsumme der Rangwerte ist $(n_1+n_2)(n_1+n_2+1)/2$. Die Erwartungswerte sind $R_{E1} = \frac{1}{2} n_1(n_1+n_2+1)$, $R_{E2} = \frac{1}{2} n_2(n_1+n_2+1)$. Bei Zutreffen der Nullhypothese werden Beobachtungs- und Erwartungswert nur geringe Unterschiede zeigen. Die Grenzen, außerhalb derer die Rangsumme liegen muß, damit das Ergebnis als signifikant angesehen werden kann, sind bereits tabelliert (Dokumenta Geigy-Wissenschaftliche Tabellen 1960 S. 124-127). In gleicher Weise kann zur Beurteilung die Differenz zwischen beobachteter und erwarteter Rangsumme herangezogen werden (Pfanzagl(44)).

Eine Verallgemeinerung des Wilcoxon-Tests für mehrere Gruppen ist der Kruskal-Wallis-Test. Hier wird von der Hypothese ausgegangen, daß der mittlere Rangwert der Gruppen bei Zutreffen der Nullhypothese nur wenig um den Gesamtmittelwert der Rangwerte schwanken wird. Nach der folgenden Formel wird eine Testgröße T

errechnet, die nach der χ^2 -Verteilung mit $(k-1)$ Freiheitsgraden beurteilt wird (k =Anzahl der Gruppen).

$$T = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^K \frac{R_i^2}{n_i} - 3(n+1)$$

wenn alle K_i gleich sind

$$T = \frac{12}{n^2(n+1)} \sum_{i=1}^K R_i^2 - 3(n+1).$$

VERSUCHSREIHEN

ENDOXAN

1. Chemismus und Wirkungsmechanismus

Es handelt sich um einen cyclischen Phosphoramid - Ester des N-Lost, N,N-Bis-(β -chloräthyl)-N,O-propylenphosphorsäureester-diamid. In dieser Form ist die Substanz cytostatisch inaktiv. Durch Phosphoramidase, welche auch in Tumorzellen reichlich vorkommt, wird dieser Ester aufgespalten, woraus die aktive Verbindung mit der bis- β -chloräthyl - Gruppierung entsteht. Erst am Wirkungsort wird aus der Transportform durch Aufspaltung des Ringes die Wirkgruppe freigesetzt wie ARNOLD et al. (1) nachwiesen. Das Bindeglied zwischen Wirk- und Trägergruppe (7,8,6) ist die Phosphorsäure, die sich zwar nach PREUSSMANN (45,46) durch andere Säuren z.B. Kohlensäure ersetzen läßt, jedoch bleibt die Aktivierung zur Wirkform meistens aus. Der für die Therapie wichtige Faktor besteht in der Geschwindigkeit der Freisetzung von Phosphoramidase innerhalb der Zelle.

Seit der Tumorthherapie mit ENDOXAN^(R) sind mehrere Arbeiten über die Beeinflussung der Biosynthese und des Stoffwechsels durch B518 (ENDOXYAN^(R)) erschienen. So greift B518 in den Kohlehydratstoffwechsel ein, indem es die Fermente Phosphorglyzeraldehyddehydrogenase in normalen Leukozyten und myeloischen Zellen (LÖHR (33)), Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (12) und Laktat-Dehydrogenase (21) hemmt. HOLZLER und Mitarbeiter (18,19) und LÖHR (32) machen das Absinken der Konzentration an Diphosphopyridin-Nukleotid (DPN) als limitierendes Glied für den verminderten Glukoseabbau verantwortlich. PALME et al., LISS, RATHGEN und HUMKE (43,30,47,48) konnten Befunde erheben, die sie entweder als Hemmung der Synthese der DNS oder aber als beschleunigten Abbau der DNS-Moleküle interpretierten. Versuche von HILZ, SCHNIEDERS, KERSTEN und GRUNDMANN (17,53,14) deuten daraufhin, daß eine erhöhte Ribonuklease-Aktivität und eine Anregung der RNS-Synthese nach B518 in ursächlichem Zusammenhang mit der DNS-Synthese steht, und die RNS als Inhibitor für die DNase wirkt.

Klinische Anwendung findet ENDOXAN^(R) bei Karzinomen des weiblichen Genitale, Sarkomen und Karzinomen anderer Organe wie z.B. der Lunge.

2. Bestimmung der LD₅₀ und der tolerierten Einzeldosis pro g Kröte

Das ENDOXAN^(R) wurde täglich in den Originalflaschen aufgelöst und weiter mit 0,6%iger NaCl-Lösung verdünnt.

Wir wählten 50 Kröten aus, teilten sie in fünf Gruppen zu je 10 Tieren und injizierten ihnen Dosen zwischen 80 mg und 40 mg in den dorsalen Lymphsack. Das Durchschnittsgewicht der 50 Kröten betrug 32g.

Dosis	Sterblichkeitsrate	Tote	Überlebende
80mg	10/10	10	0
70 "	10/10	10	0
60 "	7/10	7	3
50 "	3/10	3	7
40 "	0/10	0	10

Die LD₅₀ der Kröten liegt bei 55 mg ENDOXAN^(R). Die Tiere gingen innerhalb der ersten fünf Tage ein, unter deutlichen Zeichen einer hämorrhagischen Diathese. Überlebende wurden noch 21 Tage beobachtet.

Ausgangspunkt zur Bestimmung der Einzeldosis ENDOXAN^(R) war die LD₅₀ von 100 mg für den Menschen von 70 kg Körpergewicht. Um die ED pro Kröte zu bestimmen, wurden 60 Kröten gewogen. Das Durchschnittsgewicht betrug 28 g. Die Einzeldosis wurde von 100 mg/70kg auf 28 g Kröte umgerechnet und ergab 0,04 mg/Kröte. Diese Menge an Substanz erforderte nach dem Verdünnungsschema 4 ml Lösungsmittel, die die Aufnahmefähigkeit des dorsalen Lymphsackes überschritten. Um die Versuchsanordnung einzuhalten, waren wir deshalb gezwungen, die Einzeldosis auf 0,01 mg pro Kröte herabzusetzen.

Morphologie der Spermien von 9 Kröten nach 21 Injektionen von 0,2 ml 0,6% NaCl-Lösung. 10 Kröten waren angesetzt, eine zeigte keine Spermien im Exkret. Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involutions-formen	Summe	Mittel-starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz	Summe
lfd.Nr.						
1 74,0	3,0	77,0	17,0	3,5	0,0	20,5
2 66,5	1,0	67,5	23,0	1,0	2,0	26,0
3 66,5	3,5	70,0	17,0	3,0	4,5	24,5
4 90,5	2,0	92,5	1,0	0,0	2,0	3,0
5 61,0	0,5	61,5	26,5	1,5	2,5	30,5
6 72,5	1,5	74,0	14,5	2,0	2,5	19,0
7 81,5	0,5	82,0	10,0	3,5	0,5	14,0
Mittelwert		74,9				19,6
8 58,0	2,0	60,0	24,0	0,5	2,5	27,0
9 69,0	2,0	71,0	20,0	2,0	0,5	22,5
Mw.: 71,2	1,7	72,9	17,0	1,9	1,9	20,8

<u>Unreife Spermien</u>				<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>		
Starker Plasma-saum des ganzen Kopfes	Einge-rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufge-triebener kurzer Kopf	Summe
lfd.Nr.						
1 1,0	0,5	0,0	1,5	0,5	0,5	1,0
2 2,0	1,5	0,0	3,0	0,0	3,0	3,0
3 1,0	2,5	0,5	4,0	0,0	1,5	1,5
4 0,0	0,0	0,5	0,5	0,5	3,5	4,0
5 4,5	2,0	0,0	6,5	0,0	2,0	2,0
6 1,5	0,5	1,0	3,0	0,5	3,5	4,0
7 1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	3,0	3,0
Mittelwert			2,7			2,6
8 2,0	2,5	1,5	6,0	0,5	6,5	7,0
9 2,0	2,0	1,0	5,0	1,0	0,5	1,5
Mw.: 1,6	1,2	0,5	3,3	0,3	2,7	3,0

Morphologie der Spermien von 7 Kröten nach einmaliger Injektion von 0,21 mg Endoxan. 12 Kröten waren angesetzt, 3 Kröten gingen ein, 2 zeigten keine Spermien im Exkret. Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involutionsformen	Summe	Mittelstarker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz	Summe
lfd.Nr.						
1 57,0	1,0	58,0	23,5	3,5	2,0	29,0
2 37,0	1,5	38,5	22,5	12,0	10,0	44,5
3 61,0	1,5	62,5	17,5	5,5	3,5	26,5
4 30,5	0,5	31,0	9,0	23,5	19,0	51,5
5 34,0	1,5	35,5	27,0	6,0	12,5	45,5
6 52,5	1,5	54,0	10,5	2,5	10,5	23,5
7 82,5	1,0	83,5	6,0	0,5	1,0	7,5
Mw.: 50,6	1,2	51,8	16,6	7,6	8,4	32,6

<u>Unreife Spermien</u>			<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>			
Starker Plasma-saum des ganzen Kopfes	Eingrollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufgetriebener kurzer Kopf	Summe
lfd.Nr.						
1 0,5	3,5	5,0	9,0	0,5	3,5	4,0
2 1,5	4,0	7,0	12,5	0,0	4,5	4,5
3 2,0	4,0	2,0	8,0	0,5	2,5	3,0
4 1,5	1,0	14,5	17,0	0,0	0,5	0,5
5 1,0	3,0	10,0	14,0	0,0	5,0	5,0
6 0,5	11,0	9,5	21,0	0,0	1,5	1,5
7 1,0	1,5	1,5	4,0	0,0	5,0	5,0
Mw.: 1,1	4,0	7,1	12,2	0,1	3,3	3,4

Morphologie der Spermien von 10 Kröten mit 21 Injektionen von 0,01 mg Endoxan. 15 Kröten waren angesetzt, eine Kröte ging ein, 4 zeigten keine Spermien im Exkret. Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
				<u>Spermien</u>		
Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involutionsformen	Summe	Mittel-starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz	Summe
lfd.Nr.						
1 43,0	1,5	44,5	24,0	6,5	2,5	33,0
2 49,5	1,5	51,0	22,0	11,0	3,5	36,5
3 24,0	0,5	24,5	10,0	1,0	13,0	24,0
4 51,0	1,5	52,5	14,5	19,0	6,0	39,5
5 32,0	1,0	33,0	36,5	7,0	2,5	46,0
6 23,5	0,0	23,5	33,0	8,0	11,5	52,5
7 31,5	0,5	32,0	32,5	14,0	3,5	50,0
Mittelwert		37,3				40,2
8 7,5	0,0	7,5	10,5	15,0	3,5	29,0
9 25,0	0,0	25,0	25,0	5,5	12,5	43,0
10 36,0	0,5	36,5	26,0	11,5	3,5	41,0
Mw.: 32,3	0,7	33,0	23,4	9,8	6,2	39,4

<u>Unreife Spermien</u>				<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>		
Starker Plasma-saum des ganzen Kopfes	Einge-rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufgetriebener kurzer Kopf	Summe
lfd.Nr.						
1 3,0	0,5	11,0	14,5	0,0	13,0	13,0
2 1,5	0,5	13,0	15,0	0,0	12,0	12,0
3 0,5	0,5	65,0	66,0	0,0	11,5	11,5
4 3,0	2,0	2,5	7,5	0,0	5,5	5,5
5 2,0	0,5	19,5	22,0	0,5	3,0	3,5
6 1,5	0,5	8,0	10,0	0,0	9,5	9,5
7 4,0	1,5	3,5	9,0	0,0	4,0	4,0
Mittelwert			20,6			8,4
8 0,5	1,5	32,5	34,5	0,0	3,0	3,0
9 3,5	1,0	7,0	11,5	0,0	6,0	6,0
10 6,5	2,0	3,0	11,5	0,0	6,0	6,0
Mw.: 2,6	1,1	16,5	20,2	0,0	7,4	7,4

Morphologie der Spermien von 9 Kröten nach 14 Einzeldosen von 0,01 mg Endoxan. 15 Kröten waren angesetzt, 2 Kröten gingen ein, 4 zeigten keine Spermien im Exkret. Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involutionsformen	Summe	Mittelstarker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz	Summe
lfd.Nr.						
1 23,0	0,0	23,0	24,0	5,5	10,0	39,5
2 67,5	13,5	81,0	4,0	0,5	1,0	5,5
3 40,0	1,5	41,5	18,0	4,5	4,0	26,5
4 50,0	0,0	50,0	8,5	7,5	15,0	31,0
5 62,0	0,5	62,5	13,0	3,5	0,5	17,0
6 32,0	0,0	32,0	7,0	6,0	13,5	26,5
7 50,5	0,0	50,5	17,0	8,0	15,5	40,5
Mittelwert		48,6				26,5
8 18,0	0,0	18,0	6,0	1,5	9,5	17,0
9 43,0	0,0	43,0	17,5	9,0	9,0	35,5
Mw.: 42,9	1,7	44,6	12,8	5,1	8,7	26,5

<u>Unreife Spermien</u>			<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>			
Starker Plasma-saum des ganzen Kopfes	Eingrollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufgetriebener kurzer Kopf	Summe
lfd.Nr.						
1 1,0	2,0	15,5	18,5	0,0	6,5	6,5
2 0,0	1,0	63,0	64,0	0,0	2,0	2,0
3 0,5	0,5	7,5	8,5	0,0	3,5	3,5
4 0,5	0,5	34,0	0,0	0,0	5,0	5,0
5 3,0	0,0	12,0	15,0	0,0	5,5	5,5
6 1,0	0,5	11,5	13,0	0,0	7,5	7,5
7 3,0	2,5	7,0	12,5	0,5	16,0	16,5
Mittelwert			23,8			6,6
8 0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	10,5	10,5
9 2,0	0,0	22,5	24,5	0,0	9,5	9,5
Mw.: 1,2	0,8	19,4	21,5	0,0	7,3	7,3

Morphologie der Spermien von 12 Kröten nach 7 Einzeldosen von 0,01 mg Endoxan. 12 Kröten waren angesetzt. Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involu-tions-formen	Summe	Mittel-starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz	Summe
lfd.Nr.						
1 33,0	0,0	33,0	20,0	13,5	10,0	43,5
2 48,0	0,0	48,0	21,5	9,5	5,5	36,5
3 31,5	0,0	31,5	8,0	2,5	20,0	30,5
4 63,5	1,0	64,5	16,0	5,0	2,0	23,0
5 35,0	0,0	35,0	9,0	4,0	12,5	25,5
6 53,0	2,0	55,0	14,0	8,5	8,0	30,5
7 56,0	1,0	57,0	27,5	2,5	6,0	36,0
Mittelwert		46,2				32,2
8 82,0	1,0	83,0	7,0	0,5	4,5	12,0
9 72,0	1,0	73,0	18,5	2,0	2,0	22,5
10 54,0	1,0	55,0	11,5	3,5	7,5	22,5
11 48,0	0,5	48,5	29,5	7,0	6,5	43,0
12 57,0	0,5	57,5	7,5	2,5	7,5	17,5
Mw.: 52,8	0,8	53,5	15,8	5,0	7,7	28,5

<u>Unreife Spermien</u>				<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>		
Starker Plasma-saum des ganzen Kopfes	Einge-rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufgetriebener kurzer Kopf	Summe
lfd.Nr.						
1 3,5	0,0	9,0	12,5	0,0	11,0	11,0
2 2,0	1,0	6,5	9,5	0,0	6,0	6,0
3 0,5	2,0	30,0	32,5	0,0	5,5	5,5
4 2,0	2,0	5,5	9,5	0,0	3,0	3,0
5 1,0	1,0	32,5	34,5	0,0	5,0	5,0
6 1,5	1,5	8,5	11,5	0,0	3,0	3,0
7 0,5	0,5	4,0	5,0	0,0	1,5	1,5
Mittelwert			16,4			5,0
8 0,0	0,5	2,0	2,5	0,5	2,0	2,5
9 0,0	0,5	0,5	1,0	1,0	2,0	3,0
10 3,0	2,0	11,0	16,0	0,0	6,5	6,5
11 2,0	1,0	3,0	6,0	0,0	2,5	2,5
12 0,5	0,5	20,0	21,0	0,0	4,0	4,0
Mw.: 1,5	1,0	11,0	13,5	0,1	4,4	4,5

Zahl der Spermien pro cmm von 8 Kröten nach 21 Injektionen von 0,2 ml 0,6% NaCl-Lösung. 10 Kröten waren angesetzt, 2 zeigten keine Spermien im Exkret. Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	125	125	750	300	1300
2	175	250	300	0	725
3	75	425	375	50	925
4	50	125	125	250	550
5	175	550	575	275	1575
6	275	525	300	1850	2950
7	0	25	100	100	225
Mittelwert					1178,6
8	0	100	100	125	325
Mittelwert	109,4	265,6	328,0	368,9	1071,9
Summe	875	2125	2625	2950	8575

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 7 Kröten nach 21 Injektionen von 0,2 ml 0,6% NaCl-Lösung. Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent
1	72
2	60
3	35
4	52
5	42
6	48
7	50
Mittelwert	51,3

Zahl der Spermien pro cmm von 7 Kröten nach einmaliger Injektion von 0,21 mg Endoxan als Gesamtdosis. 12 Kröten waren angesetzt, 2 zeigten keine Spermien im Exkret, 3 gingen ein. Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	25	50	250	350	675
2	0	25	300	200	525
3	50	125	0	0	175
4	300	75	0	0	375
5	25	75	0	0	100
6	475	500	350	0	1325
7	800	550	550	500	2400
Mittelwert	293,3	200,0	207,1	150,0	796,4
Summe	1675	1400	1450	1050	5575

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 7 Kröten nach einmaliger Injektion der Gesamtdosis von 0,21 mg Endoxan. Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	prozent	Mittelwert	pH-Wert
1	7	7,0	5
2	4		5,5
3	94	49,0	5,5
4	87		6
5	80	61,3	6
6	17		6
7	80	80,0	7
Mittelwert	52,7		5,9

Zahl der Spermien pro cmm von 11 Kröten nach 21 Einzeldosen von 0,01 mg Endoxan. 15 Kröten waren angesetzt, eine Kröte ging ein und 3 zeigten keine Spermien im Exkret. Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	50	700	700	800	2250
2	0	25	50	25	100
3	0	50	50	250	350
4	0	25	25	50	100
5	225	175	575	825	1800
6	150	375	25	400	950
7	100	125	325	250	800
Mittelwert					<u>907,1</u>
8	0	0	50	250	300
9	225	200	525	1575	2525
10	475	800	425	200	1900
11	0	0	0	100	100
Mittelwert	<u>111,4</u>	<u>225,0</u>	<u>250,0</u>	<u>429,6</u>	<u>1016,0</u>
Summe	1225	2475	2750	4725	11175

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 11 Kröten nach 21 Einzeldosen von 0,01 mg Endoxan. Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent
1	68
2	33
3	17
4	59
5	62
6	43
7	<u>19</u>
Mittelwert	<u>44,4</u>
8	25
9	71
10	21
11	<u>28</u>
Mittelwert	40,5

Zahl der Spermien pro cmm von 9 Kröten nach 14 Einzeldosen von 0,01 mg Endoxan. 15 Kröten waren angesetzt, 2 Kröten gingen ein, 4 zeigten keine Spermien im Exkret. Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	325	25	250	150	750
2	25	600	1275	1875	3775
3	0	50	75	175	300
4	50	75	125	150	400
5	75	325	425	625	1450
6	50	175	325	600	1150
7	75	125	150	250	600
Mittelwert					<u>1203,6</u>
8	0	125	125	600	850
9	0	25	150	225	400
Mittelwert	<u>66,7</u>	<u>161,7</u>	<u>325,0</u>	<u>513,9</u>	<u>1075</u>
Summe	600	1525	2925	4625	9675

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 9 Kröten nach 14 Einzeldosen von 0,01 mg Endoxan. Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent
1	10
2	42
3	15
4	24
5	46
6	35
7	<u>26</u>
Mittelwert	<u>28,3</u>
8	8
9	<u>44</u>
Mittelwert	32,2

Zahl der Spermien pro cmm von 12 Kröten nach 7 Einzeldosen von 0,01 mg Endoxan. 12 Kröten waren angesetzt. Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

	lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
	1	350	575	975	325	2225
	2	0	75	75	125	325
	3	0	125	75	300	500
	4	0	25	100	225	350
	5	0	75	125	500	700
	6	0	25	0	75	100
	7	50	250	525	900	1725
Mittelwert						<u>846,4</u>
	8	25	175	350	850	1400
	9	175	500	550	750	1975
	10	225	375	275	325	1200
	11	25	100	300	75	500
	12	0	50	175	475	700
Mittelwert		<u>70,8</u>	<u>195,8</u>	<u>293,7</u>	<u>410,4</u>	<u>975,0</u>
Summe		850	2350	3525	4925	11700

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 12 Kröten nach 7 Einzeldosen von 0,01 mg Endoxan. Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

	lfd.Nr.	Prozent
	1	31
	2	35
	3	37
	4	15
	5	38
	6	39
	7	<u>27</u>
Mittelwert		<u>31,7</u>
	8	14
	9	92
	10	41
	11	78
	12	<u>40</u>
Mittelwert		40,6

3. Statistische Auswertung der Ergebnisse

A) MORPHOLOGIE

Die Mittelwerte des Kontrollversuches liegen im Bereich der durchschnittlichen Prozentzahlen des Vorversuches. Sie wurden beim Vergleich der Ergebnisse den vier Versuchsreihen als Normal- und Ausgangswerte zugrundegelegt.

Der Tod von insgesamt 6 Kröten ist wohl nicht auf das Cytostatikum zurückzuführen, da die Höchstm~~enge~~ 0,21 mg ENDOXAN^(R) beträgt, und die LD₅₀ bei 55 mg liegt. Ob die, nach dem Exkret zu beurteilende Spermi~~en~~aplasie bei 10 Tieren physiologisch war oder durch Schädigung der Mitose hervorgerufen wurde, konnte nicht geklärt werden.

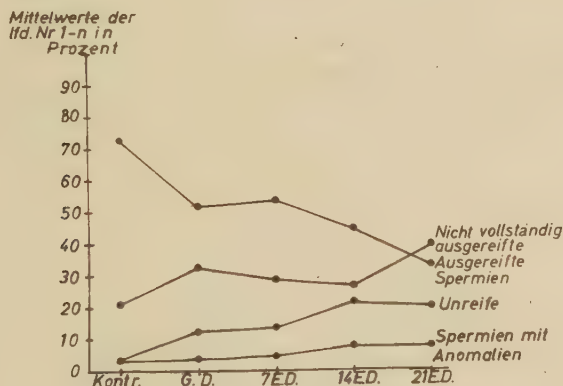


Abb.2 Die prozentuale Verteilung der morphologischen Kriterien in Abhängigkeit von der Dauer der Applikation

Beim Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Dosierungen kamen die einfache Varianzanalyse und der orthogonale Vergleich zur Anwendung. Die Varianzanalyse prüft den Unterschied zwischen den Mittelwerten mehrerer Gruppen.

Die Abb.2 zeigt die prozentualen Anteile der vier morphologischen

Hauptkriterien unter verschieden großen Gesamtmengen ENDOXAN^(R). Sie verdeutlicht, daß mit zunehmender Anzahl der Einzeldosen die ausgereiften Formen um mehr als die Hälfte zurückgehen und die unreifen Spermien um mehr als das Sechsfache ansteigen. Zum Vergleich der Ergebnisse der unreifen Spermien wurden die Tests nach Kruskal Wallis und Wilcoxon angewandt, da die Voraussetzung für die Anwendung der Varianzanalyse nicht gegeben war. Statistische Auffälligkeiten und Signifikanzen bestehen jedoch nur zwischen dem Kontrollversuch und allen vier Toxizitätsprüfungen wie auf der Abb.3 ersichtlich ist. Die Werte der nicht vollständig ausgereiften Spermien schwanken und sind in ihrer Signifikanz unterschiedlich: Kontr. und GD...^x, Kontr. und 7 ED...^x, Kontr. und 21 ED...^{xxx}, 14 ED und 21 ED...^x. Dagegen nehmen die Spermien mit Anomalien und Defekten mit der Dauer der Applikation ständig zu. Unter ihnen besonders die Formen mit unförmigen, aufgetriebenen Köpfen. Signifikanzen bestehen zwischen den 14 ED und der Kontr...^x sowie zwischen 21 ED und GD...^{xx}, 21 ED und 7 ED...^x und 21 ED und Kontr...^{xxx}. Alle Signifikanzen lassen sich auch auf die Mittelwerte der lfd.Nr.1-n übertragen, da diese von den Mittelwerten der lfd.Nr.1-7 nur geringfügig differieren. Die Auswirkungen der GD als einmalige Applikation stimmen mit denen der Gruppe der 7 ED überein.

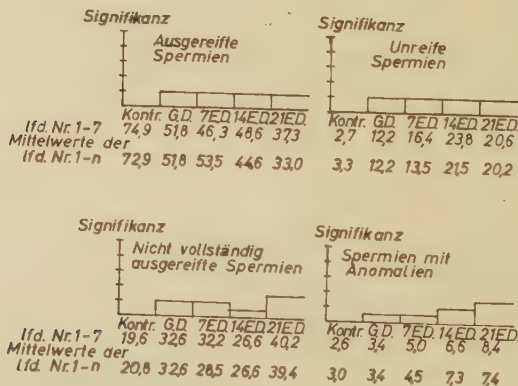


Abb.3 Morphologie. Signifikanzen zwischen den einzelnen Dosierungen

Zur Abb.3 sei hier für alle noch folgenden Darstellungen

statistischer Signifikanzen erklärt, daß der Höhenunterschied der Hästchen von einer Skaleneinheit zwischen den Dosierungen und der Kontrolle eine Irrtumswahrscheinlichkeit p von weniger als 5% bedeutet. Die Darstellung bezieht sich in ihren Höhenunterschieden auf die Mittelwerte der lfd.Nr.1-7, da ein Vergleich nur möglich ist, wenn die Zahl der Kröten bei den verschiedenen Dosen übereinstimmt.

) ZAHL

waren im Exkret einer Kröte so wenige Spermien, daß selbst bei viermaligem Zählversuch in der Zählkammer kein Spermium nachzuweisen war, wurde diese Kröte in der Tabelle nicht aufgeführt, um den Mittelwert der Versuchsreihe nicht zu stark zu senken; zumal wir keine Beweise dafür haben, daß eine stark verminderte oder aufgehobene Bildung von Spermien allein auf das Cytostatikum zurückzuführen ist.

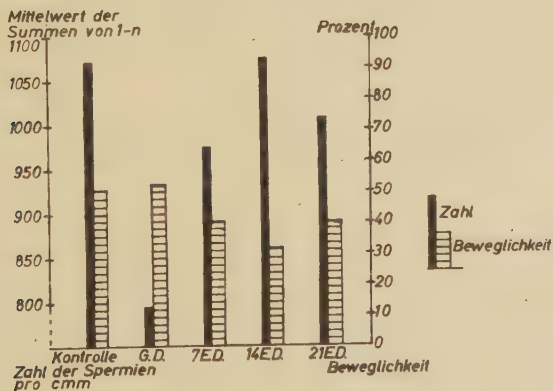


Abb.4 Der Einfluß der Applikationsdauer auf die Zahl der Spermien pro 4 cmm und auf ihre Beweglichkeit, dargestellt für die jeweiligen Mittelwerte

Der Mittelwert der Kontrollreihe entspricht dem Ergebnis des Vorversuches, er wurde beim Vergleich den Versuchsreihen als Bezugszahl zugrundegelegt. Die Mittelwerte der lfd.Nr.1-n differieren so untereinander, daß die Signifikanzen zwischen den Mittelwerten

der lfd.Nr. 1-7 auf sie übertragen werden können.

Aus der Abb.4 geht hervor, daß der Mittelwert der Gruppe GD im Vergleich zur Kontrollgruppe um fast 300 Spermien tiefer liegt. Es liess sich jedoch mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied errechnen (Abb.5), bedingt durch die erheblichen Schwankungen innerhalb einer Gruppe. Zwischen den Gruppen ist statistisch gesehen kein Unterschied zu erkennen.

Damit hat das ENDOXAN^(R) in den vorliegenden Gesamtdosen nach unserer Versuchsanordnung keine Auswirkungen auf die Anzahl der Spermien hervorgerufen.

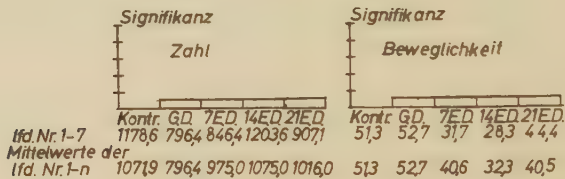


Abb.5 Darstellung der Signifikanzen für die Mittelwerte von Zahl und Beweglichkeit

C) BEWEGLICHKEIT

In der Kontrollgruppe waren bei der Beurteilung der Beweglichkeit im Exkret einer Kröte keine Spermien. Im Exkret zweier Tiere fanden wir die Keimzellen so stark vermindert, daß ein Auszählen von 1000 Spermien nicht möglich war.

Die Abb.4 zeigt eine Abnahme der Beweglichkeit unter ENDOXAN^(R)-Einwirkung bei der Gruppe mit 14 ED bis zu ca.20%. Jedoch lassen sich wiederum auf Grund der erheblichen Schwankungen innerhalb einer Gruppe mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse keine Signifikanzen errechnen. Die Prozentzahlen der Beweglichkeit aus der Gruppe GD lassen wie im Vorversuch erkennen, daß sie sich mit steigendem pH-Wert des Kloakeninhaltes von pH 5-pH 7 erhöhen. Eine Beeinflussung des pH-Wertes des entnommenen Exkretes durch das ENDOXAN ist unwahrscheinlich, da das ENDOXAN^(R) drei Wochen vorher injiziert wurde.

Bayer E 39 soluble

1. Chemismus und Wirkungsmechanismus

Aus der Reihe der Äthylenimin-Verbindungen stammt die alkylierende Substanz 2,5-Bis-methoxy-äthoxy-3,6-bis-äthylenimino-benzochinon-(1,4) (Bayer E 39 soluble). Die Äthylenimine brauchen im Organismus nicht in ihre Wirkform um- oder abgebaut zu werden. Ihre Wirkung tritt unmittelbar ein, und daher sind diese Substanzen auch toxischer als B518. Sie entsprechen nicht dem von DRUCKREY (7) gestellten Postulat der inaktiven Transportform, die erst in den Zellen fermentativ zur Wirkform aktiviert wird und möglichst selektiv wirken sollte.

Der Wirkungseintritt des E 39 sol.^(R) läßt sich ablesen an der Glykolysehemmung (29), zu der eine Aktivitätsminderung des Fermentes Phosphoglyzeraldehydenase beiträgt (33). Ebenso wie ENDOXAN^(R) senkt die Äthylenimin-Verbindung den DPN-Spiegel im Tumor (18,50). Tumorzellen und Normalgewebe der Ratte reagieren mit Ausnahme der Leber auf E 39 sol.^(R) mit einer Hemmung des Phosphateinbaues in die DNS. Als Ursache hierfür kommt eine Minderung der DNS-Synthese und ein gesteigerter DNS-Abbau infolge vermehrter Aktivität DNS-spaltender Enzyme in Betracht (RATHGEN und HUMKE (47)). Das Ausmaß des cytostatischen Effektes steht in Abhängigkeit von der Konzentration und Wirkungsdauer von E 39 soluble^(R).

2. Bestimmung der LD₅₀ und der tolerierten Einzeldosis pro g Kröte

Bayer E 39 soluble-Trockensubstanz von 10 mg wurde in Originalflaschen mit 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung aufgelöst und weiter mit 0,6%-iger NaCl-Lösung verdünnt. Die Einzeldosis wurde den Tieren als frische Lösung appliziert.

Es wurden 50 gesund aussehende Kröten von durchschnittlich 40 g in fünf Gruppen zu 10 Tieren eingeteilt. Den Kröten wurden Dosen zwischen 4,0 mg und 2,5 mg injiziert.

Dosis	Sterblichkeitsrate	Tote	Überlebende
4,0mg	10/10	10	0
3,5 "	9/10	9	1
3,2 "	6/10	6	4
3,0 "	2/10	2	8
2,5 "	0/10	0	10

Die LD_{50} liegt bei einer Dosis von ca. 3 mg Bayer E 39 solubile pro Tier. Damit liegt die LD_{50} der Kröte pro Gewichtseinheit um das Vierzigfache höher als bei der LD_{50} der Ratte nach i.p. Applikation. Letztere bewegt sich nach Angaben der Herstellerfirma je nach Lösungsmedium zwischen 1,5 mg und 2,5 mg/kg. Verantwortlich für die unterschiedliche Verträglichkeit zwischen den beiden Tierspezies ist wohl die andere Stoffwechsellage des Kaltblüters. 27 Kröten verstarben innerhalb von 14 Tagen. Überlebende wurden noch weitere 14 Tage beobachtet.

Eigenartigerweise verweigerten die Tiere nach der Spritze für mindestens 3 Wochen jegliche Nahrungsaufnahme.

Zur Bestimmung der Einzeldosis von E 39 sol. für die Versuchstiere wurde die ED von 10 mg pro 70 kg Gewicht des Menschen zugrundegelegt. Für 60 Kröten wurde ein Durchschnittsgewicht von 43,5 g ermittelt. Damit beträgt die ED pro Kröte 0,006 mg.

orphologie der Spermien von 7 Kröten mit 21 Injektionen
n 0,2 ml 0,6% NaCl-Lösung. 10 Kröten waren angesetzt,
gingen ein, eine Kröte zeigte keine Spermien im Exkret.
Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>				
Schwacher Plasma- saum des Kopfes	Involu- tions- formen	Summe	Mittel- starker Plasma- saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma- saum der unteren Kopfhälfte	Plasma- Tropfen am Schwanz	Summe	
fd.Nr.							
1 66,5	2,0	68,5	18,5	3,0	4,5	26,0	
2 81,0	1,0	82,0	9,0	3,5	1,0	13,5	
3 60,0	2,5	62,5	24,0	0,5	0,5	25,0	
4 64,5	1,5	66,0	17,5	0,5	4,0	22,0	
5 79,0	1,5	80,5	10,0	2,0	0,5	12,5	
6 56,0	2,5	58,5	27,0	4,0	3,5	34,5	
7 82,0	3,0	85,0	12,0	0,0	0,5	12,5	
w.: 69,8	2,0	71,8	16,9	1,9	2,1	20,9	

<u>Unreife Spermien</u>				<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>			
starker Plasma- saum des ganzen Kopfes	Einge- rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufge- triebener kurzer Kopf	Summe	
fd.Nr.							
1,5	2,0	0,5	4,0	0,0	1,5	1,5	
1,5	0,5	0,0	2,0	0,5	2,0	2,5	
1,5	2,5	1,5	5,5	1,0	6,0	7,0	
2,0	2,0	0,0	4,0	1,5	6,5	8,0	
1,0	3,5	0,0	4,5	0,0	2,5	2,5	
2,5	2,5	0,0	5,0	0,5	1,5	2,0	
0,5	0,5	0,0	1,0	0,0	1,5	1,5	
1,5	1,9	0,3	3,7	0,5	3,1	3,6	

Morphologie der Spermien von 10 Kröten nach einmaliger Injektion der Gesamtdosis von 0,126 mg E 39 sol. 11 Kröten waren angesetzt, eine Kröte zeigte keine Spermien im Exkret.

Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involutions-formen	Summe	Mittel-starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz	Summe
lfd.Nr.						
1 73,0	2,5	75,5	16,0	2,0	1,5	19,5
2 53,0	2,0	55,0	11,0	6,5	19,0	36,5
3 72,0	3,5	75,5	11,0	2,0	3,0	16,0
4 47,0	0,0	47,0	29,0	5,5	4,5	39,0
5 73,5	4,5	78,0	7,5	2,0	0,5	10,0
6 63,0	3,5	66,5	17,0	1,5	5,0	23,5
7 64,5	2,5	67,0	13,5	2,0	6,0	21,5
Mittelwert		66,4				23,7
8 79,5	3,0	82,5	6,0	1,0	3,5	10,5
9 82,5	2,0	84,5	4,0	1,0	4,0	9,0
10 59,5	3,5	63,0	20,5	2,5	2,0	25,0
Mw.: 66,7	2,7	69,4	13,6	2,6	4,9	21,1

<u>Unreife Spermien</u>				<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>		
Starker Plasma-saum des ganzen Kopfes	Einge-rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufge-triebener kurzer Kopf	Summe
lfd.Nr.						
1 0,0	2,0	0,5	2,5	0,0	2,5	2,5
2 0,5	2,0	2,5	5,0	0,0	3,5	3,5
3 0,0	2,5	0,0	2,5	0,5	5,5	6,0
4 1,0	5,0	4,0	10,0	0,0	4,0	4,0
5 0,5	3,0	1,0	4,5	0,5	7,0	7,5
6 1,0	4,0	3,0	8,0	0,0	2,0	2,0
7 2,0	5,0	2,5	9,5	0,0	2,0	2,0
Mittelwert			6,0			3,9
8 0,0	3,0	2,5	5,5	0,0	1,5	1,5
9 1,0	1,5	1,5	4,0	0,5	2,0	2,5
10 1,5	5,5	2,5	9,5	0,5	2,0	2,5
Mw.: 0,8	3,3	2,0	6,1	0,2	3,2	3,4

Morphologie der Spermien von 11 Kröten nach 21 Injektionen von 0,006 mg E 39. 15 Kröten waren angesetzt, eine ging ein, drei Kröten zeigten keine Spermien mehr im Exkret. Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

Ausgereifte Spermien

Nicht vollständig ausgereifte

Spermien

	Schwacher Plasma- saum des Kopfes	Involu- tions- formen	Summe	Mittel- starker Plasma- saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma- saum der unteren Kopfhälfte	Plasma- tropfen am Schwanz	Summe
lfd.Nr.							
1	34,5	1,5	36,0	17,0	2,0	5,0	24,0
2	73,5	1,0	74,5	8,5	1,0	0,5	10,0
3	67,0	0,5	67,5	12,0	2,5	1,5	16,0
4	77,5	1,5	79,0	5,0	2,0	0,5	7,5
5	67,5	2,0	69,5	11,5	1,0	7,5	20,0
6	61,0	2,0	63,0	8,5	5,0	3,0	16,5
7	60,0	0,5	60,5	15,0	12,5	1,0	28,5
			64,3				17,5
Mittelwert							
8	86,5	2,5	89,0	3,5	1,0	1,0	5,5
9	25,0	0,0	25,0	26,0	11,0	6,0	43,0
10	82,5	2,0	84,5	9,0	1,5	0,5	11,0
11	78,0	4,0	82,0	7,5	0,5	3,0	11,0
Mw.: 64,8	1,6		66,4	11,2	3,6	2,7	17,5

Unreife Spermien

Spermien mit Anomalien und

Defekten

	Starker Plasma- saum des ganzen Kopfes	Einge- rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufge- triebener kurzer Kopf	Summe
lfd.Nr.							
1	0,0	3,5	33,5	37,0	0,0	3,0	3,0
2	0,5	2,5	9,5	12,5	0,0	3,0	3,0
3	0,5	0,5	10,5	11,5	0,5	4,5	5,0
4	0,5	2,5	6,5	9,5	0,0	1,0	1,0
5	3,5	1,5	4,5	9,5	0,0	4,0	4,0
6	1,5	1,5	10,0	13,0	0,5	7,0	7,5
7	4,5	2,5	1,0	8,0	0,0	3,0	3,0
				14,4			3,8
Mittelwert							
8	0,0	2,0	1,0	3,0	0,0	2,5	2,5
9	1,5	1,5	24,0	27,0	0,0	5,0	5,0
10	1,5	0,5	1,0	3,0	0,5	1,0	1,5
11	0,5	1,0	2,0	3,5	0,0	3,5	3,5
Mw.: 1,3	1,8		9,4	12,5	0,1	3,5	3,0

Morphologie der Spermien von 13 Kröten nach 14 Einzeldosen von 0,006 mg E 39. 15 Kröten waren angesetzt, 2 zeigten keine Spermien mehr im Exkret. Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involutionsformen	Summe	Mittel-starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz	Summe
lfd.Nr.						
1 48,0	1,0	49,0	31,0	5,0	6,5	42
2 67,0	1,5	68,5	13,0	2,0	2,5	17
3 79,5	0,5	80,0	5,5	0,5	4,0	10
4 82,5	1,5	84,0	3,5	1,5	1,0	6
5 85,5	2,0	87,5	1,0	0,0	3,0	4
6 69,5	2,5	72,0	1,5	0,0	7,5	9
7 85,0	0,5	85,5	5,0	0,0	1,0	6
Mittelwert		75,2				13
8 58,5	1,5	60,0	24,5	2,0	1,0	27
9 84,0	1,5	85,5	1,0	0,5	2,0	3
10 84,5	3,0	87,5	3,0	0,0	4,0	7
11 77,0	1,5	78,5	15,0	2,0	1,0	18
12 78,0	1,0	79,0	9,0	0,5	3,5	13
13 75,5	2,5	78,0	13,0	1,0	0,5	14
Mw.: 75,0	1,5	76,5	9,7	1,3	2,7	13

<u>Unreife Spermien</u>			<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>			
Starker Plasma-saum des ganzen Kopfes	Einge-rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufge-triebener kurzer Kopf	Summe
lfd.Nr.						
1 2,0	1,0	2,0	5,0	0,5	3,0	3,5
2 0,5	3,0	5,0	8,5	0,0	5,5	5,5
3 1,0	4,0	3,0	8,0	0,5	1,5	2,0
4 0,5	1,0	3,5	5,0	0,5	5,0	5,5
5 0,0	0,5	2,5	3,0	0,0	5,5	5,5
6 0,0	2,0	13,5	15,5	0,0	3,5	3,5
7 0,0	2,0	3,0	5,0	1,0	2,5	2,5
Mittelwert			7,1			4,1
8 1,0	1,0	4,5	6,5	0,0	6,0	6,0
9 0,0	1,5	9,0	10,5	0,0	0,5	0,5
10 0,0	0,5	1,0	1,5	0,0	4,0	4,0
11 0,5	0,5	1,5	2,5	0,0	1,0	1,0
12 0,0	3,0	1,0	4,0	0,0	4,0	4,0
13 1,5	2,5	2,0	6,0	0,0	1,5	1,5
Mw.: 0,5	1,8	4,0	6,3	0,2	3,3	3,5

Morphologie der Spermien von 11 Kröten nach 7 Einzeldosen
 von 0,006 mg E 39. 15 Kröten waren angesetzt, 4 zeigten keine
 Spermien im Exkret. Prozentsatz von je 200 ausgewerteten
 Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Schwacher Plasma- saum des Kopfes	Involutions- formen	Summe	Mittel- starker Plasma- saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma- saum der unteren Kopfhälfte	Plasma- tropfen am Schwanz	Summe
lfd.Nr.						
1 85,5	4,0	89,5	4,5	0,0	2,0	6,5
2 76,0	3,5	79,5	11,5	0,5	2,5	14,5
3 54,5	1,0	55,5	25,0	3,0	2,5	30,5
4 76,5	3,5	80,0	7,0	0,5	1,0	8,5
5 70,0	3,5	73,5	8,0	1,0	2,0	11,0
6 83,5	2,5	86,0	7,5	1,5	0,5	9,5
7 77,0	0,5	77,5	12,5	0,5	2,5	15,5
Mittelwert		77,4				13,6
8 55,0	2,0	57,0	27,0	2,5	3,5	33,0
9 70,5	1,0	71,5	22,0	2,5	0,0	24,5
10 69,5	6,0	75,5	9,5	0,5	2,5	12,5
11 91,0	3,5	94,5	1,5	0,0	1,5	3,0
Mw.: 73,5	2,8	76,3	12,5	1,1	1,7	15,3

<u>Unreife Spermien</u>			<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>			
Starker Plasma- saum des ganzen Kopfes	Einge- rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufge- triebener kurzer Kopf	Summe
lfd.Nr.						
1 0,0	1,5	0,0	1,5	0,5	2,0	2,5
2 0,5	1,0	1,5	3,0	0,5	2,5	3,0
3 1,0	3,5	3,5	8,0	1,0	5,0	6,0
4 0,0	1,0	2,5	3,5	0,5	7,5	8,0
5 1,5	0,5	0,0	2,0	1,5	12,0	13,5
6 1,0	0,0	1,5	2,5	0,5	1,5	2,0
7 2,0	1,0	2,0	5,0	0,0	2,0	2,0
Mittelwert			3,6			5,3
8 2,0	1,0	2,5	5,5	0,0	4,5	4,5
9 1,0	0,0	1,0	2,0	0,0	2,0	2,0
10 1,0	4,5	1,5	7,0	0,5	4,5	5,0
11 0,0	0,0	1,5	1,5	0,0	1,0	1,0
Mw.: 0,8	1,2	1,9	3,9	0,5	4,0	4,5

Zahl der Spermien pro cmm von 7 Kröten nach 21 Injektionen von 0,2 ml 0,6% NaCl-Lösung. 10 Kröten waren angesetzt, 2 gingen ein, eine Kröte zeigte keine Spermien im Exkret.

Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	0	250	425	500	1175
2	75	250	150	100	575
3	125	125	600	300	1150
4	300	325	200	325	1150
5	175	650	500	450	1775
6	0	100	275	475	850
7	225	250	200	525	1200
Mittelwert	128,6	278,6	335,7	382,1	1125,0
Summe	900	1950	2350	2675	7875

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 7 Kröten nach 21 Injektionen von 0,2 ml 0,6% NaCl-Lösung. Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent	Mittelwert	pH-Wert
1	76		5
2	21		5
3	44	45,0	5
4	39		5
5	52	52,0	5,5
6	69		6
7	49	59,0	6
Mittelwert	50,0		5,4

Zahl der Spermien pro cmm von 10 Kröten nach einmaliger Injektion der Gesamtdosis von 0,126 mg E 39. 11 Kröten waren angesetzt, eine zeigte keine Spermien im Exkret.

Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	300	50	225	0	575
2	0	275	475	75	825
3	75	600	175	100	950
4	225	800	600	425	2050
5	75	600	250	125	1050
6	250	450	250	225	1175
7	25	75	25	0	125
Mittelwert					964,3
8	425	25	325	150	925
9	550	425	550	325	1850
10	250	575	575	700	2100
Mittelwert	222,5	387,5	345,0	207,5	1162,5
Summe	2225	3875	3450	2075	11625

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 10 Kröten nach einmaliger Injektion der Gesamtdosis von 0,126 mg E 39.

Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent	Mittelwert	pH-Wert
1	60		5
2	95	77,5	5
3	77		5,5
4	85	81,0	5,5
5	85		6
6	4		6
7	36		6
Mittelwert	63,1	52,3	
8	76		6
9	88		6
10	25		6
Mittelwert	63,1		5,7

Zahl der Spermien pro cmm von 11 Kröten nach 21 Injektionen von 0,006 mg E 39. 15 Kröten waren angesetzt, eine ging ein, 3 Kröten zeigten keine Spermien im Exkret. Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	0	0	25	150	175
2	0	0	75	575	650
3	800	750	275	125	1950
4	25	450	125	25	625
5	575	650	250	475	1950
6	25	50	0	25	100
7	250	100	0	0	350
Mittelwert					828,6
8	475	600	175	275	1525
9	25	125	225	0	375
10	450	600	575	250	1875
11	250	575	475	700	2000
Mittelwert	261,4	354,5	200,0	236,4	1052,3
Summe	2875	3900	2200	2600	11575

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 11 Kröten nach 21 Injektionen von 0,006 mg E 39. Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent
1	77
2	67
3	65
4	10
5	22
6	8
7	70
Mittelwert	45,6
8	92
9	79
10	55
11	90
Mittelwert	57,7

Zahl der Spermien von 13 Kröten nach 14 Injektionen von
0,006 mg E 39. 15 Kröten waren angesetzt, 2 zeigten keine
Spermien im Exkret. Erste Entnahme 2 Stunden nach
Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	75	125	575	350	1125
2	25	75	175	0	275
3	200	600	600	800	2200
4	200	400	375	425	1400
5	575	525	775	875	2750
6	325	325	350	500	1500
7	50	75	0	0	125
Mittelwert					<u>1336,4</u>
8	375	550	600	550	2075
9	400	250	325	200	1175
10	450	550	450	250	1700
11	50	175	50	0	275
12	300	125	0	0	425
13	75	175	25	0	275
Mittelwert	238,5	303,8	330,8	303,8	1176,9
Summe	3100	3950	4300	3950	15300

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 13 Kröten nach
14 Injektionen von 0,006 mg E 39. Entnahme in der 2.-5.
Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent
1	40
2	86
3	16
4	90
5	41
6	79
7	74
Mittelwert	<u>60,9</u>
8	68
9	38
10	75
11	72
12	89
13	95
Mittelwert	<u>66,5</u>

Zahl der Spermien von 11 Kröten nach 7 Injektionen von 0,006 mg E 39. 15 Kröten waren angesetzt, 4 zeigten keine Spermien im Exkret. Erste Entnahme 2 Stunden nach

Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	0	0	50	300	350
2	0	0	25	25	50
3	25	200	0	0	225
4	250	525	1025	575	2375
5	0	575	625	750	1950
6	0	25	250	325	600
7	75	0	25	0	100
Mittelwert					<u>807,1</u>
8	25	150	175	50	400
9	0	100	75	75	250
10	125	300	275	125	825
11	450	600	650	625	2325
Mittelwert	<u>86,4</u>	<u>225,0</u>	<u>288,6</u>	<u>259,1</u>	<u>859,1</u>
Summe	950	2475	3175	2850	9450

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 11 Kröten nach 7 Injektionen von 0,006 mg E 39. Entnahme in der 2.-5.

Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent
1	95
2	89
3	84
4	81
5	94
6	66
7	<u>21</u>
Mittelwert	<u>75,7</u>
8	40
9	4
10	93
11	<u>56</u>
Mittelwert	65,7

3. Statistische Auswertung der Ergebnisse

A) Morphologie

Die Mittelwerte der vier Hauptkriterien von der Kontrollgruppe liegen im Bereich der Werte aus den Vorversuchen und wurden beim Vergleich der Gruppen zur Toxizitätsprüfung als Bezugswerte übernommen.

Von den insgesamt 70 Tieren kamen die Spermien von 52 Kröten zur Auswertung. Während der Versuchsdauer gingen sieben Kröten ein, und elf zeigten keine Spermien im Exkret. Die Ursache der Keimzellaplasie bzw. der fehlenden Spermatorrhoe der elf Kröten wurde nicht geklärt. Die Ursachen könnten liegen: 1. in der Physiologie der Tiere 2. in einem Nicht-Ansprechen auf die Dosis Choriongonadotropin 3. in einem Schaden des Keimepithels, der durch das Cytostatikum hervorgerufen wurde.

Wir konnten beobachten, daß die Köpfe ausgereifter Spermien in Abhängigkeit von der Dauer der Cytostatikum-Einwirkung bis zu einem Drittel länger waren als normal.

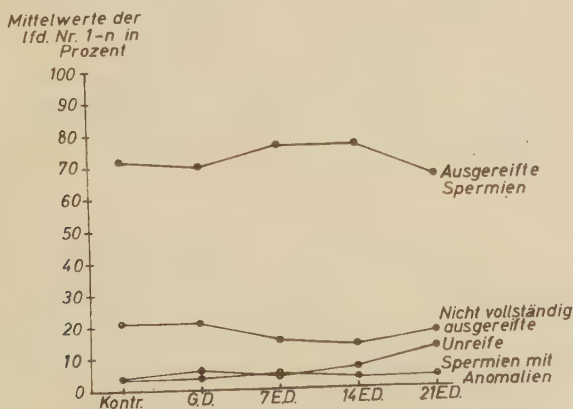


Abb.6 Prozentuale Abhängigkeit des morphologischen Gesamtbildes von der Dauer der Applikation

Beim Vergleich der Ergebnisse innerhalb der morphologischen Kriterien waren die Voraussetzungen zur einfachen Varianzanalyse gegeben

bis auf die Ergebnisse der unreifen Spermien. Zu deren Vergleich wurden wiederum die Tests nach Kruskal-wallis und Wilcoxon herangezogen.

Die Abb.6 zeigt nur geringe Abweichungen von den Mittelwerten der Kontrollgruppe. In den Gruppen der 7 ED und 14 ED ist der Prozentsatz der ausgereiften Formen etwas höher als in der Kontrolle, dafür liegen dann die Zahlen der nicht ganz ausgereiften Spermien etwas niedriger (Abb.6). Die einzigen statistisch auffälligen und signifikanten Unterschiede ergeben sich bei den Unreifen zwischen 21 ED und den anderen vier Gruppen (Abb.7). Maßgeblich beteiligt an diesem Anstieg um das Dreifache sind wiederum die Übergangsformen der Spermatiden. Die normal geformten Köpfe der Spermien, die unter den Bayer E 39 sol.-Injektionen gebildet wurden, waren zum Teil erheblich länger als alle vorher gesehenen. Wir konnten in keiner Gruppe der Toxizitätsprüfung mehr Spermien von Bufo vulgaris mit Kernanomalien zählen als in der Kontrollgruppe.

Nach dem statistischen Bild hat dieses Cytostatikum in den angegebenen Dosen keine sichere Wirkung auf die Spermiogenese gezeigt.

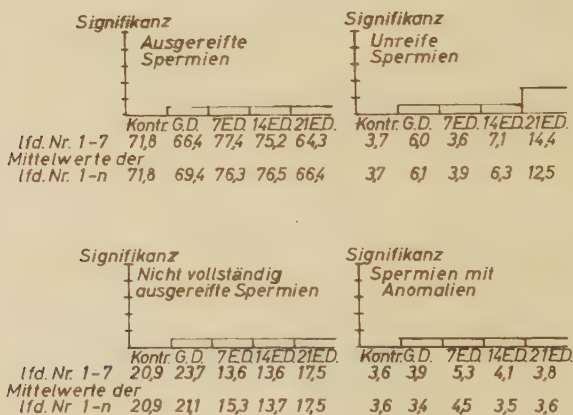


Abb.7 Darstellung der Signifikanzen zwischen den Ergebnissen in der Morphologie

B) Zahl

Wie schon erwähnt (S.37) zeigten elf Kröten bei viermaligem Zählen

kein Spermium im Kloakeninhalt. Diese Werte sind im Mittelwert der fünf Gruppen nicht berücksichtigt. Das Ergebnis der Kontrollreihe entspricht wiederum dem der Vorversuche. Alle Mittelwerte dieser Vorversuchsserie liegen ungefähr auf gleicher Höhe. Die größte Differenz von mehr als 300 Spermien ist aus den schon früher erwähnten Gründen für eine Signifikanz mit $F_{0,05}$ nicht ausreichend (Abb.8). Aus der Darstellung der Signifikanz läßt sich eine Wirkung des Cyto-statikums nicht ablesen.

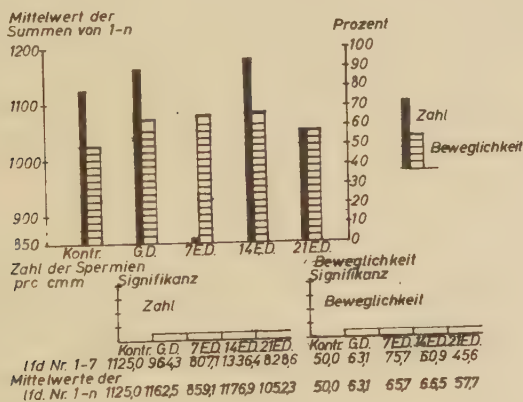


Abb.8 Abhängigkeit der Mittelwerte der Anzahl Spermien pro 4 mm und der Beweglichkeit von der Dauer der Applikation. Signifikanzen.

C) Beweglichkeit

Die Spermien waren noch mindestens 40 Minuten nach der Entnahme beweglich, im Vergleich zur Kontrollgruppe etwa doppelt so lange.

Alle Mittelwerte der lfd.Nr.1-n liegen höher als der Kontrollwert, der mit dem der Vorversuche nicht wesentlich differiert. Signifikanzen ließen sich nicht errechnen wie aus Abb.8 ersichtlich ist. Da die Differenz zwischen den Mittelwerten der lfd.Nr. 1-7 größer ist als bei denen der lfd.Nr. 1-n, kann auch bei diesen Mittelwerten nicht mit Signifikanzen gerechnet werden.

Die Tabelle der Kröten mit der einmaligen Injektion der Gesamtdosis

von 0,126 mg E 39 sol.^(R) läßt erkennen, daß die Anzahl der beweglichen Spermien in dieser Gruppe nicht mit steigendem pH-Wert zunimmt.

Trenimon

1. Chemismus und Wirkungsmechanismus

Trenimon stammt aus der Reihe der Äthylenimin-Gruppe und ist chemisch ein 2,3,5-Tris-äthylenimino-benzochinon-(1,4). Seine alkylierenden Eigenschaften wirken sich auf den Stoffwechsel der Zelle wesentlich stärker aus als bei dem verwandten 2,5-Bis-methoxy-äthoxy-3,6-bis äthylenimino-benzochinon-(1,4). Die Glykolyse wird gehemmt, der DPN-Gehalt sinkt ab (18,19), die DNS-Synthese wird gemindert und die Aktivitäten der 5,2 und 7,4 DNasen erfahren Änderungen (47,48).

Nach den bisher bekannt gewordenen experimentellen Untersuchungen gibt es für die Hemmung der Zellvermehrung durch alkylierende Substanzen mehrere Ursachen: 1. Erniedrigung des DPN-Gehaltes, 2. Hemmung der Glykolyse, 3. Absinken des ATP-Gehaltes, 4. Verminderte Synthese von Eiweiß und Nukleinsäuren. Vielleicht kommt auch eine direkte Reaktion des Cytostatikums mit Nukleinsäuren in Betracht.

2. Bestimmung der LD₅₀ und der tolerierten Einzeldosis pro g Kröte

In den Originalflaschen wurden 0,2 mg Trenimon-Trockensubstanz in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung vollständig gelöst und mit 0,6%iger NaCl-Lösung verdünnt. Die Lösung wurde sofort mit einer Tuberkulin-Spritze in den dorsalen Lymphsack injiziert.

Vierzig durchschnittlich kräftige Kröten wurden in vier Gruppen zu je zehn Tieren eingeteilt, und es wurden ihnen einmalig Dosen zwischen 0,05 mg und 0,2 mg injiziert. Vorher hatten wir an je zwei Tieren mit Dosen zwischen 0,1 mg und 1 mg die ungefähre tödliche Dosis erprobt.

<u>Dosis</u>	<u>Sterblichkeitsrate</u>	<u>Tote</u>	<u>Überlebende</u>
0,20mg	10/10	10	0
0,15 "	8/10	8	2
0,10 "	2/10	2	8
0,05 "	0/10	0	10

Die LD₅₀ liegt wegen der hohen Toxizität der Substanz in einem engen Dosisbereich zwischen 0,10 mg und 0,15 mg pro Kröte von ca. 30 g. 20 Tiere gingen innerhalb von sieben Tagen ein. Die 20 Überlebenden wurden noch 14 Tage beobachtet. Die eingegangenen Kröten zeigten deutliche Spuren von Blutungen aus den Körperöffnungen.

Die Einzeldosis für den Menschen wird mit 0,2 mg i.v. angegeben. Bezieht man die Einzeldosis auf 70 kg, so ergeben sich pro g Kröte 0,000003 mg. Für die Versuchsreihe wurden 60 Kröten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 30 g ausgesucht. Damit beträgt die Einzeldosis pro Kröte 0,0001 mg TRENIMON^(R).

Morphologie der Spermien von 8 Kröten nach 21 Einzeldosen von 0,2 ml 0,6% NaCl-Lösung. 10 Kröten waren angesetzt, 2 gingen ein. Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>				<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>		
Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involu-tions-formen	Summe	Mittel-starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz	Summe
lfd.Nr.						
1 72,0	1,0	73,0	15,5	2,0	2,5	20,0
2 68,5	0,5	69,0	17,5	2,5	2,5	22,5
3 75,0	5,0	80,0	14,5	1,5	0,0	16,0
4 64,5	3,0	67,5	16,5	3,0	3,5	23,0
5 70,5	2,0	72,5	17,0	2,0	2,0	21,0
6 71,0	1,0	72,0	18,0	2,0	0,5	20,5
7 56,5	3,0	<u>59,5</u>	27,0	4,0	2,5	<u>33,5</u>
Mittelwert		<u>70,5</u>				<u>22,4</u>
8 79,0	1,5	80,5	8,0	2,0	0,5	10,5
Mw.: 69,6	2,1	71,7	16,8	2,3	1,8	20,9

<u>Unreife Spermien</u>				<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>		
Starker Plasma-saum des ganzen Kopfes	Einge-rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufge-triebener kurzer Kopf	Summe
lfd.Nr.						
1 1,5	0,5	0,5	2,5	1,0	3,5	4,5
2 1,0	1,5	0,0	2,5	0,0	6,0	6,0
3 1,5	2,0	0,0	3,5	0,0	0,5	0,5
4 2,5	2,0	1,0	5,5	0,5	3,5	4,0
5 1,5	1,0	0,5	3,0	0,5	3,0	3,5
6 2,0	1,0	1,0	4,0	1,0	2,5	3,5
7 2,5	2,5	0,0	<u>5,0</u>	0,0	2,0	<u>2,0</u>
Mittelwert			<u>3,7</u>			<u>3,4</u>
8 0,5	3,5	0,0	4,0	1,0	4,0	5,0
Mw.: 1,6	1,8	0,3	3,7	0,5	3,1	3,6

Morphologie der Spermien von 7 Kröten nach einmaliger
Injektion der Gesamtdosis von 0,0021 mg Trenimon. 11 Kröten
waren angesetzt, 4 zeigten keine Spermien im Exkret.

Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Schwacher Plasma- saum des Kopfes	Involu- tions- formen	Summe	Mittel- starker Plasma- saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma- saum der unteren Kopfhälfte	Plasma- tropfen am Schwanz	Summe
lfd.Nr.						
1 70,5	1,5	72,0	14,5	2,0	4,0	20,5
2 25,0	0,5	25,5	19,5	14,0	18,5	52,0
3 61,5	0,5	62,0	9,5	2,0	5,5	17,0
4 81,0	2,5	83,5	4,5	1,5	2,0	8,0
5 65,5	1,0	66,5	15,5	3,5	5,0	24,0
6 78,0	1,5	79,5	6,0	1,5	4,5	12,0
7 76,0	4,0	80,0	2,5	1,5	4,0	8,0
Mw.: 65,3	1,6	66,9	10,2	3,6	6,2	20,0

<u>Unreife Spermien</u>			<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>			
Starker Plasma- saum des ganzen Kopfes	Einge- rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufge- triebener kurzer Kopf	Summe
lfd.Nr.						
1 2,0	2,0	2,0	6,0	0,5	1,0	1,5
2 0,5	0,5	8,0	19,0	0,5	3,0	3,5
3 0,5	7,0	5,5	13,0	0,5	7,5	8,0
4 1,5	1,0	1,0	3,5	0,5	4,5	5,0
5 1,5	2,5	3,0	7,0	0,0	2,5	2,5
6 0,5	3,5	0,5	4,5	0,0	4,0	4,0
7 1,0	0,5	2,0	3,5	0,0	8,5	8,5
Mw.: 1,6	2,3	4,5	8,4	0,3	4,4	4,7

Morphologie der Spermien von 9 Kröten nach 21 Einzeldosen von 0,0001 mg Trenimon. 15 Kröten waren angesetzt, 3 Kröten gingen ein, weitere 3 zeigten keine Spermien im Exkret.

Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>				<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involutions-formen	Summe	Mittel-starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	<u>Spermien</u>			Summe
				Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz		
lfd.Nr.							
1	31,5	0,0	31,5	6,0	4,0	18,0	28,0
2	35,0	0,0	35,0	20,5	8,0	8,5	37,0
3	10,0	0,0	10,0	6,0	5,0	8,0	19,0
4	37,5	2,0	39,5	13,5	1,5	6,5	21,0
5	7,0	1,0	8,0	5,0	7,0	9,5	21,0
6	26,5	3,0	29,5	7,5	10,5	7,5	25,0
7	34,0	1,5	35,5	3,5	2,5	11,5	17,0
Mittelwert		27,0					24,0
8	44,5	1,5	46,0	15,5	10,5	4,5	30,0
9	56,0	2,0	58,0	11,5	2,5	3,5	17,0
Mw.: 31,4	1,2	32,6		9,8	5,4	8,9	24,0

<u>Unreife Spermien</u>				<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>			
Starker Plasma-saum des ganzen Kopfes	Einge-rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufgetriebener kurzer Kopf		Summe
lfd.Nr.							
1	3,0	0,0	31,0	34,0	0,0	6,5	6,5
2	1,0	0,5	14,0	15,5	1,0	11,5	12,5
3	1,0	0,0	52,5	53,5	0,5	17,0	17,0
4	0,5	2,0	20,0	22,5	0,0	17,5	17,5
5	2,5	1,5	57,0	61,0	0,0	9,5	9,5
6	4,5	2,5	21,5	28,5	1,0	15,5	16,5
7	1,5	1,0	33,0	35,5	0,0	11,5	11,5
Mittelwert			35,8				13,5
8	3,0	0,5	12,0	15,5	0,0	8,0	8,0
9	3,5	0,5	8,0	12,0	0,0	12,5	12,5
Mw.: 2,3	0,9	27,7	30,9	0,3	12,1		12,1

Morphologie der Spermien von 9 Kröten nach 14 Einzeldosen von 0,0001 mg Trenimon. 12 Kröten waren angesetzt, 2 Kröten gingen ein, eine zeigte keine Spermien im Exkret. Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involutionsformen	Summe	Mittelstarker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz	Summe
lfd.Nr.						
1 44,5	0,0	44,5	16,0	8,5	11,0	35,5
2 48,0	1,5	49,5	16,5	2,5	11,0	30,0
3 31,0	1,0	32,0	18,5	11,0	6,0	35,5
4 70,5	4,0	74,5	10,0	1,0	0,5	11,5
5 44,0	0,5	44,5	27,5	13,0	2,5	43,0
6 73,0	4,0	77,0	6,5	3,0	1,5	11,0
7 47,0	2,5	49,5	21,5	3,0	3,0	27,5
		<u>53,1</u>				<u>27,7</u>
Mittelwert						
8 28,0	0,5	28,5	12,0	5,5	10,0	27,5
9 63,0	2,5	65,5	11,0	2,5	4,0	17,5
Mw.: 49,9	1,8	51,7	15,4	5,5	5,7	26,6

<u>Unreife Spermien</u>			<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>			
Starker Plasma-saum des ganzen Kopfes	Eingekollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufgetriebener kurzer Kopf	Summe
lfd.Nr.						
1 5,0	0,0	12,5	17,5	0,0	2,5	2,5
2 3,0	1,0	13,0	17,0	0,0	3,5	3,5
3 2,0	1,0	16,0	19,0	0,0	13,5	13,5
4 0,5	1,0	3,5	5,0	0,0	9,0	9,0
5 4,0	2,5	1,5	8,0	0,0	4,5	4,5
6 1,0	2,0	2,0	5,0	0,0	7,0	7,0
7 1,0	0,5	14,5	16,0	0,5	6,5	7,0
			<u>12,5</u>			<u>6,7</u>
Mittelwert						
8 1,0	2,0	34,5	37,5	0,0	6,5	6,5
9 2,5	1,5	4,5	8,5	0,0	8,5	8,5
Mw.: 2,3	1,3	11,3	14,9	0,0	6,8	6,8

Morphologie der Spermien von 11 Kröten mit 7 Einzeldosen von 0,0001 mg Trenimon. 12 Kröten waren angesetzt, eine ging ein. Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involu-tions-formen	Summe	Mittel-starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz	Summe
lfd.Nr.						
1 68,5	3,5	72,0	11,5	4,0	2,5	18,0
2 33,5	0,0	33,5	28,0	9,0	3,5	40,5
3 53,0	4,0	57,0	10,5	1,5	12,5	24,5
4 57,0	0,5	57,5	22,5	2,5	4,5	29,5
5 67,5	2,5	70,0	12,5	0,5	3,5	16,5
6 61,5	1,0	62,5	15,5	1,5	8,0	25,0
7 63,5	3,5	67,0	15,5	0,5	4,0	20,0
Mittelwert		59,2				24,9
8 55,0	2,0	57,0	17,5	1,0	5,5	24,0
9 34,0	1,5	35,5	17,5	5,5	6,0	29,0
10 38,5	2,0	40,5	23,5	6,5	3,5	33,5
11 44,5	2,5	47,0	13,0	4,0	14,0	31,0
Mw.: 52,4	2,2	54,5	17,0	3,3	6,2	26,5

<u>Unreife Spermien</u>			<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>			
Starker Plasma-saum des ganzen Kopfes	Einge-rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufge-triebener kurzer Kopf	Summe
lfd.Nr.						
1 2,5	1,5	1,0	5,0	0,0	5,0	5,0
2 0,5	0,5	22,5	23,5	0,0	2,5	2,5
3 1,5	1,5	9,5	12,5	0,5	5,5	6,0
4 1,0	1,0	4,0	6,0	1,0	6,0	7,0
5 1,5	2,0	4,0	7,5	0,0	6,0	6,0
6 1,0	2,0	3,5	6,5	0,0	6,0	6,0
7 0,5	1,0	5,0	6,5	0,0	6,5	6,5
Mittelwert			9,6			5,6
8 1,0	2,5	8,0	11,5	0,0	7,5	7,5
9 1,0	1,0	27,0	29,0	0,0	6,5	6,5
10 3,5	1,5	9,0	14,0	0,0	12,0	12,0
11 1,0	3,0	14,5	18,5	0,0	3,5	3,5
Mw.: 1,3	1,6	9,9	12,8	0,1	6,1	6,2

Zahl der Spermien pro cmm von 8 Kröten nach 21 Injektionen von 0,2 ml 0,6%iger NaCl-Lösung. 10 Kröten waren angesetzt, 2 gingen ein. Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	0	50	25	150	225
2	0	175	200	800	1175
3	100	300	125	175	700
4	125	725	100	375	1325
5	250	625	725	575	2175
6	0	50	125	75	250
7	0	175	175	700	1050
Mittelwert					985,7
8	100	650	300	400	1450
Mittelwert	71,9	343,8	221,9	406,2	1043,8
Summe	575	2750	1775	3250	8350

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 8 Kröten nach 21 Injektionen von 0,2 ml 0,6% NaCl-Lösung. Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent
1	83
2	72
3	54
4	70
5	30
6	39
7	10
Mittelwert	51,1
8	39
Mittelwert	49,6

Zahl der Spermien pro cmm von 7 Kröten nach einmaliger Injektion der Gesamtdosis von 0,0021 mg Trenimon. 11 Kröten waren angesetzt, 4 zeigten keine Spermien im Exkret. Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	0	0	75	400	475
2	550	200	200	550	1500
3	25	25	75	100	225
4	25	200	375	250	850
5	225	0	125	0	350
6	0	400	375	1000	1775
7	0	0	75	175	250
Mittelwert	117,9	117,9	185,7	353,5	775,0
Summe	825	825	1300	2475	5420

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 7 Kröten nach einmaliger Injektion der Gesamtdosis von 0,0021 mg Trenimon. Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent
1	73
2	24
3	86
4	79
5	92
6	94
7	94
Mittelwert	77,4

Zahl der Spermien pro cmm von 8 Kröten nach 21 Injektionen von 0,0001 mg Trenimon. 15 Kröten waren angesetzt, 3 Kröten gingen ein, 4 zeigten keine Spermien im Exkret. Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	0	200	150	25	375
2	0	0	25	25	50
3	50	250	225	75	600
4	0	50	0	25	75
5	0	0	25	25	50
6	250	100	375	125	850
7	0	0	250	175	425
Mittelwert					346,4
8	0	0	100	25	125
Mittelwert	37,5	75,0	143,8	62,5	318,8
Summe	300	600	1150	500	2550

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 8 Kröten nach 21 Einzeldosen von 0,0001 mg Trenimon. Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent
1	43
2	11
3	62
4	69
5	42
6	6
7	79
Mittelwert	44,6
8	11
Mittelwert	40,4

Zahl der Spermien pro cmm nach 14 Einzeldosen von 0,0001 mg Trenimon von 9 Kröten. 12 Kröten waren angesetzt, 2 Kröten gingen ein, eine zeigte keine Spermien im Exkret. Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	0	100	0	0	100
2	125	425	200	775	1525
3	225	200	450	1000	1875
4	25	225	300	175	725
5	0	25	175	550	750
6	75	75	175	125	450
7	200	50	325	25	600
Mittelwert					860,7
8	0	75	750	1350	2175
9	250	1200	0	0	1450
Mittelwert	100,0	263,9	263,9	444,4	1072,2
Summe	900	2375	2375	4000	9650

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 9 Kröten nach 14 Einzeldosen von 0,0001 mg Trenimon. Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent
1	16
2	33
3	61
4	78
5	12
6	29
7	50
Mittelwert	39,9
8	88
9	93
Mittelwert	51,1

Zahl der Spermien pro cmm von 11 Kröten nach 7 Einzeldosen von 0,0001 mg Trenimon. 12 Kröten waren angesetzt, eine ging ein. Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	200	125	175	375	875
2	0	0	75	50	125
3	225	150	250	275	900
4	0	175	675	525	1375
5	475	375	600	1025	2475
6	50	650	375	50	1125
7	425	225	225	200	1075
Mittelwert					1135,7
8	650	450	475	325	1900
9	125	175	150	375	825
10	100	75	75	150	400
11	0	125	775	525	1425
Mittelwert	204,5	229,5	350,0	352,3	1136,4
Summe	2250	2525	3850	3875	12500

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 11 Kröten nach 7 Einzeldosen von 0,0001 mg Trenimon. Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent
1	65
2	18
3	34
4	27
5	86
6	91
7	84
Mittelwert	57,9
8	88
9	36
10	15
11	8
Mittelwert	50,2

3. Statistische Auswertung der Ergebnisse

A) Morphologie

Zum Vergleich der Ergebnisse der Toxizitätsprüfung wurden die Mittelwerte der Gruppe herangezogen, die mit krötenphysiologischer Kochsalzlösung gespritzt wurde. Diese Werte liegen im Bereich der durchschnittlichen Prozentzahlen des Vorversuches. Während der Cytostatikum-Einwirkung gingen sechs Kröten ein, deren Tod wohl kaum in Zusammenhang mit dem TRENIMON^(R) zu bringen ist, da die höchste verabreichte Menge mindestens 60 Mal kleiner ist als die ermittelte LD₅₀.

Von den insgesamt 70 angesetzten Kröten gingen 18 während der Versuchsdauer ein. Acht Kröten zeigten keine Spermien im Exkret. Die Ursache hierfür konnte nicht geklärt werden. Für die Auswertung der Spermien verblieben demnach noch 44 Kröten.

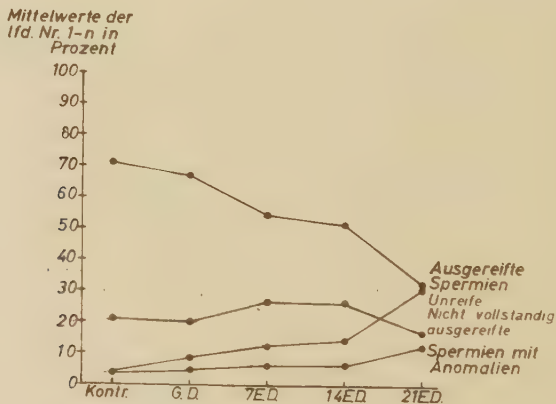


Abb.9 Prozentuale Abhängigkeit der Ergebnisse der Morphologie von der Applikationsdauer

In der Abb.9 sind die durchschnittlichen Prozentzahlen der vier Hauptgruppen der Spermien in den fünf Gruppen dargestellt. Mit steigender Anzahl der Einzeldosen fällt der Anteil der ausgereiften Spermien um mehr als die Hälfte ab. Statistische Auffälligkeiten und Signifikanzen ergaben die orthogonalen Vergleiche zwischen 21 ED und allen anderen Gruppen...^{xxx} sowie zwischen 14 ED und der

trollgruppe...^x(Abb.10). Die Mittelwerte der Gruppen der "nicht vollständig ausgereiften" Spermien ergeben im Vergleich miteinander keine Unterschiede. Die unreifen Formen nehmen um das Acht- bis hundertfache zu. Der Anstieg von 14,9% bei 14 ED auf 30,9% bei 21 ED ist nach dem Wilcoxon-Test besonders auffällig. Der überwiegende Anteil fällt auf die Übergangsformen der Spermatiden, die als unreife Spermien ohne Schwanz aufgeführt werden. Keine Signifikanz besteht zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit einmaliger Injektion der Höchstmenge von 0,0021 mg TRENIMON^(R), sowie zwischen 7 ED und 14 ED. Der F-Wert aller bestehenden Signifikanzen beträgt 0,001.

Das Vierfache steigt auch die Zahl der Spermien mit Kernanomalien an, in Form von aufgetriebenen, dicken Köpfen. Zwischen den

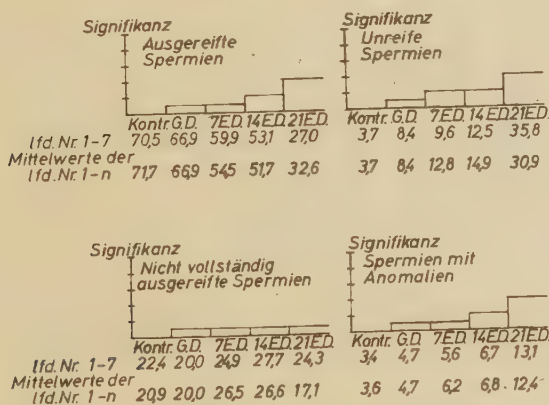


Abb.10 Morphologie. Darstellung der Signifikanzen zwischen den Ergebnissen in der Morphologie

Die ersten drei aufgeführten Gruppen bestehen keine deutlichen Unterschiede. Die Wirkung der einmaligen Injektion der Gesamtdosis ist nach der statistischen Auswertung gleich Null, 14 ED und 21ED...^x, 7 ED und den anderen Gruppen...^{xxx}. Erklärungen zur Darstellung sind in der Auswertung der Ergebnisse der Morphologie bei ENDO-AN^(R) gegeben.

B) Zahl

In der Gruppe der 21 ED zeigten drei Kröten keine Spermien im Exkret, und bei einer waren die Keimzellen so vereinzelt, daß das Ergebnis der viermaligen Entnahme gleich Null war. Diese Kröte wurde aus vorher erklärten Gründen in der Tabelle nicht aufgeführt. Zwischen dem Mittelwert der Gruppe der Kontrolltiere und dem entsprechenden Wert der Vorversuche besteht kein deutlicher Unterschied. Der Kontrollwert wurde zum Vergleich herangezogen.

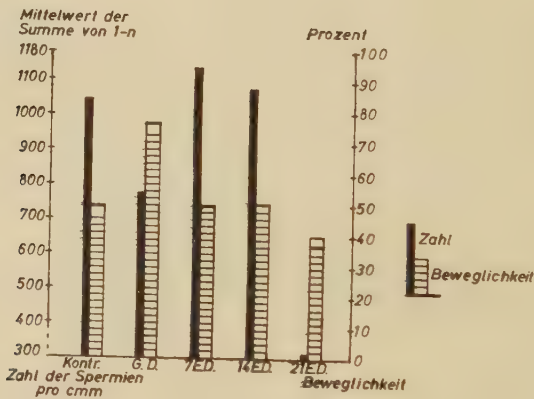


Abb.11 Abhängigkeit der Mittelwerte der Anzahl Spermien pro 4 cmm und der Beweglichkeit von der Dauer der Applikation

Auffällig ist in der Abb.11 der zwischen 300 und 350 liegende Wert bei 21 ED, während die anderen Durchschnittszahlen dicht beieinanderliegen. Obwohl die Werte um das Dreifache differieren, ließen sich auf Grund der Streuungen innerhalb der Gruppen mit Hilfe der Varianzanalyse keine Signifikanzen errechnen (Abb.12). Also hat TRENIMON^(R) der statistischen Berechnung nach auf die Zahl der Spermien unter den angegebenen Versuchsbedingungen keine Wirkung.

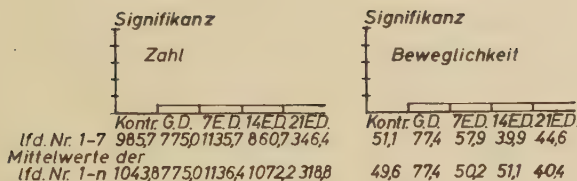


Abb.12 Darstellung der Signifikanzen bei Zahl und Beweglichkeit

Beweglichkeit

statistisch gesehen lässt sich eine Beeinflussung der Beweglichkeit durch das TRENIMON^(R) ebenfalls nicht nachweisen (Abb.12). Die Beweglichkeit in der Gruppe GD liegt mit fast 80% sehr hoch (Abb.11). Eine Beeinflussung des pH-Wertes durch das drei Wochen vor der Auswertung gegebene TRENIMON^(R) ist unwahrscheinlich. Messungen der Sauerstoffkonzentration des Kloakeninhaltes wurden nicht vorgenommen. Der etwas erniedrigte Wert der Gruppe mit 21 ED ist auf einen großen Anteil unreifer Spermien zurückzuführen, die nur zu einem Teil beweglich sind.

Versuchspräparat Bayer DG428

1. Chemismus und Wirkungsmechanismus

Das Präparat Bayer DG 428 ist nicht im Handel, und eine Ausbietung ist von der Herstellerfirma auch nicht vorgesehen.

Diese Substanz ist ein Thymin-Derivat, welches seinen Eigenschaften nach zu den Antimetaboliten zählt. Antimetabolite haben in ihrer chemischen Struktur große Ähnlichkeit mit den Metaboliten wie Vitamine, Aminosäuren oder Nukleinsäuren. Auf Grund dieser Ähnlichkeit können sie kompetitiv Bestandteile des Stoffwechsels verdrängen, wobei sie durch ihre spezifische chemische Differenz in der Lage sind, den weiteren Reaktionsablauf des Enzymsystems zu blockieren. Thymin läßt sich nur in der Desoxyribonukleinsäure (DNS) nachweisen. Da die DNS in allen Tumoren vermehrt gebildet wird, wurde der Versuch unternommen, mit dem Thymin-Derivat Bayer DG428, das 2-o-Chlorbenzyl-merkpto-4-dimethylamino-5-methylpyrimidin-chlorhydrat, die Synthese bestimmter Tumorproteine zu blockieren. Im Gegensatz zum ENDOXAN und zu den ÄTHYLENIMINEN zerstört diese Substanz nicht die Tumorzellen, sondern verhindert deren Neubildung durch Blockierung der notwendigen Nukleinsäuren (56); auch soll die Glykolyse der Tumorzellen durch sie vermindert werden.

2. Bestimmung der LD₅₀ und der tolerierten Einzeldosis pro g Kröte

Die Substanz ist in wasser unlöslich und wurde wie von Bayer empfohlen in Äthanol gelöst. Auf die alleinige Applikation des Äthanols reagierten die Kröten mit Benommenheit, waren aber nach 5-6 Stunden wieder normal reaktionsfähig.

Fünf Gruppen zu je 10 Kröten wurden einmalig Dosen zwischen 6 mg und 2 mg Bayer DG428 in den dorsalen Lymphsack gespritzt. Das Durchschnittsgewicht der 50 Kröten lag bei 30 g.

<u>Dosis</u>	<u>Sterblichkeitsrate</u>	<u>Tote</u>	<u>Überlebende</u>
6 mg	9/10	9	1
5 "	7/10	7	3
4 "	3/10	3	7
3 "	1/10	1	9
2 "	0/10	0	10

Die LD₅₀ der Kröten liegt bei 4,5 mg Bayer DG428^(R). Die Tiere starben in der zweiten bis dritten Woche nach der Applikation. Die zu diesem Zeitpunkt noch lebenden Tiere wurden noch weitere drei Wochen beobachtet. In dieser Zeit starben noch 2 Kröten mit 3 mg und 2 mit 4 mg, deren Tod uns altersbedingt schien. Blutungen wie nach ENDOXAN-, TRENIMON- und E39 sol.-Injektionen waren bei keiner Kröte sichtbar; es entstand aber eine erhebliche Kachexie.

Die Einzeldosis für den Menschen wird mit 60-100 mg/70 kg per os pro die angegeben. Um die Einzeldosis pro Kröte zu bestimmen, wurden wiederum 60 Kröten gewogen. Das Durchschnittsgewicht betrug 53 g. Für jede Kröte würde damit die ED in Bezug auf die beim Menschen applizierte Dosis bei 0,05 mg liegen. Um aber eine zusätzliche Belastung durch eine mehrmalige Verabfolgung des Lösungsmittels an den Tieren zu vermeiden, setzten wir eine 0,1%ige wässrige Suspension des Cytostatikums an. Den Kröten wurde davon 0,1 ml mit einer Tuberkulin-Spritze injiziert. Damit entspricht die ED rund 0,1 mg Bayer DG428^(R).

Diese Versuchsserie lief 2-3 Monate später als die Untersuchungen nach Verabfolgung von ENDOXAN, TRENIMON und E39 sol.

Morphologie der Spermien von 8 Kröten nach 21 Einzeldosen von 0,2 ml 0,6% NaCl-Lösung. 8 Kröten waren angesetzt.

Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Ifd.Nr.	Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involu-tions-formen	Summe	Mittel-starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	<u>Spermien</u>	
					Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz
1	54,5	0,0	54,5	13,5	6,0	12,5
2	52,0	0,0	52,0	6,5	3,0	18,0
3	64,5	3,0	67,5	6,5	4,5	5,5
4	42,5	1,0	43,5	8,0	3,5	15,0
5	65,0	3,0	68,0	7,5	2,5	4,5
6	58,5	2,5	61,0	16,5	4,0	5,5
7	71,0	4,5	75,5	10,0	2,5	3,0
Mittelwert			60,2			22,6
8	73,5	7,0	80,5	4,0	2,0	4,0
Mw.: 60,2	2,6	62,8	9,1	3,5	8,5	21,1

<u>Unreife Spermien</u>				<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>		
Ifd.Nr.	Starker Plasma-saum des ganzen Kopfes	Einge-rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufge-triebener kurzer Kopf
1	1,0	2,5	10,0	13,5	0,0	0,0
2	0,5	2,5	15,0	18,0	0,0	2,5
3	1,0	1,5	12,5	15,0	0,0	1,0
4	0,0	1,0	27,5	28,5	0,0	1,5
5	1,0	1,5	13,0	15,5	0,0	2,0
6	1,5	2,0	5,0	8,5	0,5	4,0
7	0,5	0,0	3,5	4,0	0,5	4,5
Mittelwert				14,7		2,6
8	0,0	0,5	3,5	4,0	0,5	5,0
Mw.: 0,7	1,4	11,3	13,4	0,2	2,5	2,7

morphologie der Spermien von 8 Kröten nach einmaliger
Injektion der Gesamtdosis von 2,1 mg DG428. 10 Kröten
waren angesetzt, 2 Kröten gingen ein. Prozentsatz von
je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Schwacher Plasma- saum des Kopfes	Involu- tions- formen	Summe	Mittel- starker Plasma- saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma- saum der unteren Kopfhälfte	Plasma- tropfen am Schwanz	Summe
fd.Nr.						
1 46,5	1,0	47,5	12,0	4,0	13,5	29,5
2 48,5	0,0	48,5	6,0	4,5	20,0	30,5
3 60,0	2,0	62,0	6,0	2,0	9,0	17,0
4 33,0	1,0	34,0	15,5	4,0	13,5	33,0
5 54,0	2,5	56,5	14,0	3,5	9,0	26,5
6 66,5	3,0	69,5	4,5	2,0	11,5	18,0
7 51,0	1,0	<u>52,0</u>	12,0	2,0	15,0	<u>29,0</u>
Mittelwert		<u>52,2</u>				<u>26,2</u>
8 29,5	0,0	29,5	20,5	6,0	14,0	<u>40,5</u>
Mw.: 48,6	1,3	49,9	11,3	3,5	13,2	28,0

<u>Unreife Spermien</u>			<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>			
Starker Plasma- saum des ganzen Kopfes	Einge- rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufge- triebener kurzer Kopf	Summe
fd.Nr.						
1 2,0	3,0	14,0	19,0	0,0	4,0	4,0
2 2,5	6,0	10,5	19,0	0,5	1,5	2,0
3 0,5	2,0	15,5	18,0	0,0	3,0	3,0
4 3,0	3,5	20,5	27,0	0,5	5,5	6,0
5 1,0	2,5	10,0	13,5	0,0	3,5	3,5
6 1,5	1,0	9,0	11,5	0,0	1,0	1,0
7 0,0	3,0	12,5	<u>15,5</u>	0,0	3,5	<u>3,5</u>
Mittelwert			<u>17,6</u>			<u>3,2</u>
8 2,0	3,5	19,0	24,5	0,0	5,5	<u>5,5</u>
Mw.: 1,7	3,0	13,9	18,6	0,1	3,4	3,5

Morphologie der Spermien von 10 Kröten nach 21 Einzeldosen von je 0,1 mg DG428. 12 Kröten waren angesetzt, 2 Kröten gingen ein. Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

Ausgereifte Spermien

Nicht vollständig ausgereifte Spermien

lfd.Nr.	Schwacher Plasma-saum des Kopfes	Involuti-ons-formen	Summe	Mittel-starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	te Spermien		
					Starker Plasma-saum der unteren Kopfhälfte	Plasma-tropfen am Schwanz	Summe
1	52,5	1,0	53,5	6,5	2,0	17,5	26,0
2	65,5	1,0	66,5	10,5	3,5	4,0	18,0
3	29,0	0,0	29,0	20,0	6,0	16,0	42,0
4	23,5	1,5	25,0	10,5	6,5	29,0	46,0
5	21,0	1,0	22,0	14,0	6,5	31,0	51,5
6	51,5	3,0	54,5	14,5	3,5	12,0	30,0
7	44,0	3,5	47,5	19,0	4,5	6,5	30,0
Mittelwert			42,6				34,8
8	25,0	1,0	26,0	22,5	7,0	9,0	38,5
9	48,0	1,5	49,5	15,5	5,0	6,0	26,5
10	47,5	4,5	52,0	11,0	4,0	9,0	24,0
Mw.: 40,8		1,8	42,6	14,4	4,8	14,0	33,2

Unreife Spermien

Spermien mit Anomalien und Defekten

lfd.Nr.	Starker Plasma-saum des ganzen Kopfes	Einge-rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufge-triebener kurzer Kopf	Summe
1	0,5	0,5	15,0	16,0	0,0	4,5	4,5
2	0,0	3,5	9,0	12,5	0,5	2,5	3,0
3	1,0	1,5	25,5	28,0	0,0	1,0	1,0
4	0,5	1,0	26,5	28,0	0,0	1,0	1,0
5	0,5	0,0	22,5	23,0	0,0	3,5	3,5
6	1,0	2,5	8,5	12,0	0,0	3,5	3,5
7	0,5	4,0	14,0	18,5	0,0	4,0	4,0
Mittelwert				19,7			2,9
8	1,0	3,0	25,0	29,0	0,0	6,5	6,5
9	1,0	3,0	13,0	17,0	0,5	6,5	7,0
10	1,0	4,0	15,0	20,0	0,0	4,0	4,0
Mw.: 0,7		2,3	17,4	20,4	0,1	3,7	3,8

morphologie der Spermien von 11 Kröten nach 14 Einzeldosen
n je 0,1 mg DG428. 12 Kröten waren angesetzt, eine Kröte
ng ein. Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>			<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Schwacher Plasma- saum des Kopfes	Involu- tions- formen	Summe	Mittel- starker Plasma- saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma- saum der unteren Kopfhälfte	Plasma- tropfen am Schwanz	Summe
fd.Nr.						
1 15,5	0,5	16,0	6,5	3,5	28,0	38,0
2 46,0	2,5	48,5	17,0	4,5	11,5	33,0
3 28,5	0,5	29,0	2,5	5,0	12,0	19,5
4 45,5	1,5	47,0	30,5	3,5	3,0	37,0
5 23,5	0,0	23,5	5,0	1,5	7,5	14,0
6 46,0	0,5	46,5	31,0	3,5	4,5	39,0
7 23,5	1,5	25,0	13,5	6,5	25,0	45,0
Mittelwert		33,6				32,2
8 40,5	0,5	41,0	34,0	5,0	4,0	43,0
9 29,0	1,5	30,5	20,5	9,5	11,5	41,5
10 54,5	4,5	59,0	19,0	3,0	6,0	28,0
11 34,0	0,5	34,5	17,5	7,0	10,0	34,5
w.: 35,1	1,3	36,4	17,9	4,8	11,2	33,9

<u>Unreife Spermien</u>			<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>			
Starker Plasma- saum des ganzen Kopfes	Einge- rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufge- triebener kurzer Kopf	Summe
fd.Nr.						
1 0,5	2,5	41,5	44,5	0,0	1,5	1,5
2 1,5	3,0	12,0	16,5	0,0	2,0	2,0
3 1,0	6,0	42,0	49,0	0,0	2,5	2,5
4 1,5	5,5	3,5	10,5	0,0	5,5	5,5
5 0,5	4,0	53,0	57,5	0,0	5,0	5,0
6 2,0	2,0	8,0	12,0	0,0	2,5	2,5
7 0,0	1,0	26,5	27,5	0,0	2,5	2,5
Mittelwert			31,1			3,1
8 1,0	2,5	10,5	14,0	0,0	2,0	2,0
9 2,0	1,5	22,0	25,5	0,5	2,0	2,5
10 0,5	5,0	3,5	9,0	0,0	4,0	4,0
11 1,5	0,5	26,5	28,5	0,0	2,5	2,5
w.: 1,0	3,1	22,7	26,8	0,0	2,9	2,9

Morphologie der Spermien von 10 Kröten nach 7 Einzeldosen von je 0,1 mg DG428. 12 Kröten waren angesetzt, 2 Kröten gingen ein. Prozentsatz von je 200 ausgewerteten Spermien.

<u>Ausgereifte Spermien</u>				<u>Nicht vollständig ausgereifte Spermien</u>			
Schwacher Plasma- saum des Kopfes	Involu- tions- formen	Summe	Mittel- starker Plasma- saum der unteren Kopfhälfte	Starker Plasma- saum der unteren Kopfhälfte	Plasma- tropfen am Schwanz	Summe	
lfd.Nr.							
1 42,5	2,5	45,0	27,5	4,0	7,5	39,0	
2 28,5	0,0	28,5	14,5	8,0	22,0	44,5	
3 60,0	1,0	61,0	13,5	1,0	8,5	23,0	
4 49,0	2,5	51,5	22,5	7,0	6,5	36,0	
5 65,5	3,0	68,5	15,5	2,5	5,0	23,0	
6 45,5	2,5	47,0	11,5	2,5	19,0	33,0	
7 45,5	1,5	48,0	36,5	5,0	6,5	48,0	
Mittelwert		49,2				35,2	
8 35,0	3,5	38,5	34,5	5,5	10,5	50,5	
9 45,5	8,0	53,5	13,5	2,0	13,5	29,0	
10 48,0	3,0	51,0	31,5	3,5	7,5	42,5	
Mw.: 46,5	2,7	49,2	22,1	4,1	10,7	36,9	

<u>Unreife Spermien</u>				<u>Spermien mit Anomalien und Defekten</u>			
Starker Plasma- saum des ganzen Kopfes	Einge- rollter Kopf	Ohne Schwanz	Summe	Doppelter Schwanz	Aufge- triebener kurzer Kopf	Summe	
lfd.Nr.							
1 0,0	4,5	7,5	12,0	0,5	3,5	4,0	
2 0,5	0,5	25,0	26,0	0,0	1,0	1,0	
3 0,5	1,5	9,5	11,5	0,5	4,0	4,5	
4 0,5	1,0	8,5	10,0	0,0	2,5	2,5	
5 1,5	0,5	4,5	6,5	0,0	2,0	2,0	
6 0,5	4,0	15,0	19,5	0,0	0,5	0,5	
7 1,5	1,0	0,0	2,5	0,0	1,5	1,5	
Mittelwert			12,6			2,3	
8 0,5	1,0	6,5	8,0	0,5	2,5	3,0	
9 0,0	0,0	14,5	14,5	0,0	3,0	3,0	
10 0,5	0,0	2,5	3,0	1,0	2,5	3,5	
Mw.: 0,6	1,4	9,3	11,3	0,3	2,3	2,6	

hl der Spermien pro cmm von 8 Kröten nach 21 Injektionen
n 0,2 ml 0,6% NaCl-Lösung. 8 Kröten waren angesetzt. Erste
Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	175	50	325	650	1200
2	150	200	275	75	700
3	225	200	200	350	975
4	100	250	425	600	1375
5	0	25	400	800	1225
6	100	200	175	175	650
7	0	125	125	150	400
Mittelwert					932,1
8	150	275	150	325	900
Mittelwert	112,5	165,6	259,4	390,6	928,1
Summe	900	1325	2075	3125	7425

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 8 Kröten nach 21
Injektionen von 0,2 ml 0,6% NaCl-Lösung. Entnahme in der
2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent	Mittelwert	pH-Wert
1	48		5
2	37	42,5	5
3	10		5,5
4	49	44,0	5,5
5	29		5,5
6	90		6
7	85	68,3	6
Mittelwert	49,7		
8	30		6
Mittelwert	47,2		5,6

Zahl der Spermien pro cmm von 8 Kröten nach einmaliger
Injektion der Gesamtdosis von 2,1 mg DG428. 10 Kröten
waren angesetzt, 2 Kröten gingen ein. Erste Entnahme
2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	175	500	550	675	1900
2	25	0	275	175	475
3	25	75	175	175	450
4	475	250	250	75	1050
5	0	0	275	375	650
6	300	375	525	275	1475
7	50	300	225	175	750
Mittelwert					964,3
8	0	175	200	200	575
Mittelwert	131,2	209,4	309,4	265,6	915,6
Summe	1050	1675	2475	2125	7325

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 8 Kröten nach
einmaliger Injektion der Gesamtdosis von 2,1 mg DG428.
Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent	Mittelwert	pH-Wert
1	33		5
2	61	44,4	5
3	32		5
4	19		5,5
5	18	38,0	5,5
6	77		5,5
7	70		6
Mittelwert	44,3	67,0	
8	64		6
Mittelwert	47,6		5,4

Zahl der Spermien pro cmm von 10 Kröten nach 21 Einzeldosen von je 0,1 mg DG428. 12 Kröten waren angesetzt, 2 Kröten gingen ein. Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	100	100	200	100	500
2	0	0	25	150	175
3	100	25	75	125	325
4	0	0	25	50	75
5	200	150	250	650	1250
6	175	125	100	125	525
7	0	125	175	100	400
Mittelwert					464,3
8	50	50	175	325	600
9	75	50	150	550	825
10	0	25	25	75	125
Mittelwert	70,0	65,0	120,0	225,0	480,0
Summe	700	650	1200	2250	4800

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 10 Kröten nach 21 Einzeldosen von 0,1 mg DG428. Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent	Mittelwert	pH-Wert
1	14		5
2	41		5
3	14	25,2	5
4	32		5
5	20		5,5
6	6	13	5,5
7	66		6
Mittelwert	27,6		
8	61	45,3	6
9	9		6
10	21		7
Mittelwert	28,4		5,6

Zahl der Spermien pro cmm von 11 Kröten nach 14 Einzeldosen von 0,1 mg DG428. 12 Kröten waren angesetzt, eine Kröte ging ein. Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	100	250	475	575	1400
2	0	25	0	75	100
3	0	0	75	75	150
4	100	100	225	175	600
5	525	1075	1125	975	3700
6	450	375	625	600	2050
7	225	275	425	525	1450
Mittelwert					1350,0
8	200	600	850	325	1975
9	175	250	250	475	1150
10	50	25	0	0	75
11	400	400	325	225	1350
Mittelwert	202,3	306,8	397,7	454,5	1272,7
Summe	2225	3375	4375	4025	14000

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 11 Kröten nach 14 Einzeldosen von 0,1 mg DG428. Entnahme in der 2.-5. Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent	Mittelwert	pH-Wert
1	29		5
2	4		5
3	64	35,2	5
4	17		5
5	62		5
6	17		5,5
7	13	35,3	5,5
Mittelwert	29,4		
8	76		5,5
9	16		6
10	90	54,0	6
11	56		6
Mittelwert	40,4		5,4

ahl der Spermien pro cmm von 10 Kröten nach 7 Einzeldosen
on 0,1 mg DG428. 12 Kröten waren angesetzt, 2 Kröten gingen
in. Erste Entnahme 2 Stunden nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Nach 2Std.	3Std.	4Std.	5Std.	Summe
1	50	50	125	25	250
2	0	50	125	75	250
3	0	0	125	100	225
4	75	150	200	175	600
5	50	750	500	1075	2375
6	50	500	1075	325	800
7	0	100	250	250	600
Mittelwert					728,6
8	250	200	425	400	1275
9	150	175	375	675	1375
10	100	1350	275	275	2000
Mittelwert	72,5	297,5	272,5	332,5	975,0
Summe	725	2975	2725	3325	9750

Beweglichkeit der Spermien in Prozent von 10 Kröten nach
Einzeldosen von 0,1 mg DG428. Entnahme in der 2.-5.
Stunde nach Hormoninjektion.

lfd.Nr.	Prozent	Mittelwert	pH-Wert
1	52		5
2	16		5
3	84	38,2	5
4	1		5
5	64		5,5
6	77		5,5
7	84	73,4	5,5
Mittelwert	54,0		
8	91		5,5
9	51		5,5
10	63	63	6
Mittelwert	58,3		5,4

3. Statistische Auswertung der Ergebnisse

A) Morphologie

Die Mittelwerte des Kontrollversuches liegen bei den ausgereiften Spermien und unreifen Keimzellen nicht im Bereich der Prozentzahl der Vorversuche. Die Lebensbedingungen für diese acht Kröten waren dieselben wie für die Kröten der vorherigen Kontrollgruppen. Es ist jedoch möglich, daß die späte Jahreszeit (Oktober) auf die Spermatogenese einen Einfluß ausübte, indem die unreifen zu Ungunsten der ausgereiften Formen um das Drei- bis Vierfache zunahmen. Ein statistischer Vergleich aller Kontrollgruppen ergab für diese beiden Hauptkriterien einen deutlichen Unterschied. Für den Vergleich zwischen den fünf Gruppen wurden die Mittelwerte dieser Kontrollgruppe als Bezugswert zugrundegelegt.

Zu einem Vergleich zwischen TRENIMON, ENDOXAN und E39 sol. konnten die Ergebnisse nach Applikation von DG428 nicht herangezogen werden, da allein schon zwischen den Werten der Kontrollgruppe dieser Reihe (DG428) und den Kontrollgruppen der anderen Präparate ein signifikanter Unterschied bestand.

Von den 46 Kröten, die den Einwirkungen des DG428 ausgesetzt waren gingen sieben ein. Ihren Tod führen wir nicht auf das Cytostatikum zurück, da die Einzeldosis 45 Mal geringer ist als die ermittelte LD₅₀. Außerdem ist der Zeitraum zwischen der ersten Injektion und dem Eintritt des Todes, verglichen mit dem Zeitraum bei der LD₅₀-Bestimmung, kleiner. Es muß auch bei allen Versuchen berücksichtigt werden, daß die Injektionen nicht unter sterilen Kautelen vorgenommen wurden.

Aus der Abb.13 erkennen wir einen leichten Abfall der ausgereiften und einen Anstieg der nicht vollständig ausgereiften Spermien. Statistische Auffälligkeiten und Signifikanzen bestehen nach der einfachen Varianzanalyse bei den ausgereiften Spermien zwischen 14 ED und 7 ED sowie GD...^x und 14 ED und Kontr....^{xxx} (Abb.14), sowie zwischen 21 ED und der Kontrolle...^x. Bei dem zweiten morphologischen Hauptkriterium errechneten wir signifikante Unterschiede zwischen der Kontr. und den Gruppen mit 7 ED und 21 ED....^x.

zentual ist der Anteil unreifer Spermien nach 14 ED im Vergleich
den anderen Dosierungen auffällig und signifikant größer wie der
skal-Wallis-Test ergab.

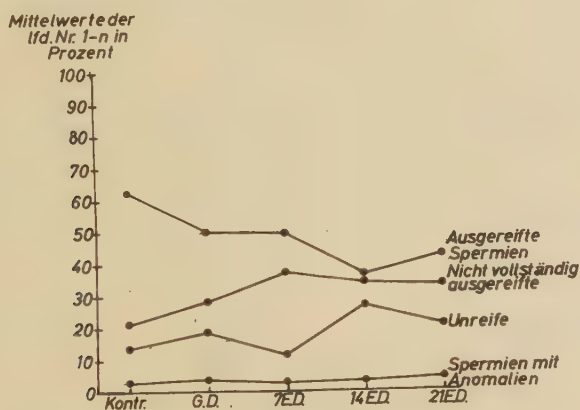


Abb.13 Der Einfluß der Applikationsdauer auf die
morphologischen Kriterien

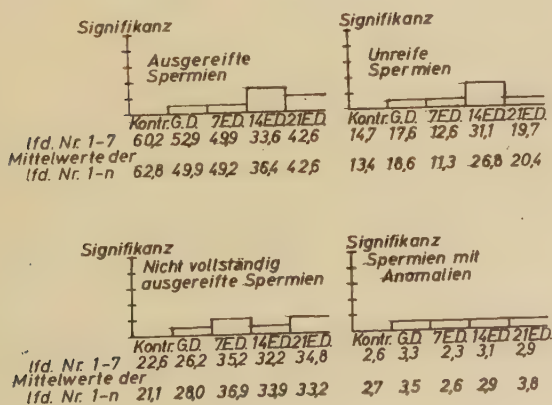


Abb.14 Morphologie. Signifikanzen zwischen den
einzelnen Dosierungen

Bei den anormalen und defekten Spermien ergaben sich durch die Applikation des Cytostatikums keine prozentualen Veränderungen gegenüber der Kontrollreihe. Unterschiede in der Wirkung zwischen der einmaligen Verabreichung von 2,1 mg Bayer DG428^(R) und der Aufteilung dieser Menge in 21 Einzeldosen bestehen nicht (Abb.13 und 14).

B) Zahl

Der Mittelwert der Anzahl Spermien pro cmm der Kontrollreihe unterscheidet sich nicht signifikant von den Mittelwerten, die sich in den Vorversuchen und für die anderen Kontrollreihen ergeben haben. Damit gab es keinen entscheidenden Einwand gegen den Vergleich der

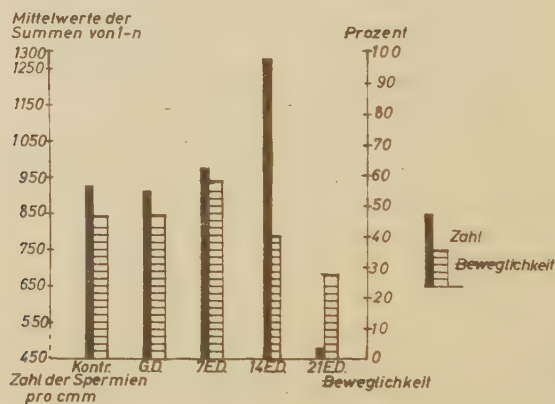


Abb.15 Einfluß der Applikationsdauer auf die Zahl der Spermien pro cmm und auf ihre Beweglichkeit, dargestellt für die jeweiligen Mittelwerte

Werte der Toxizitätsprüfung mit denen der anderen drei Cytostatica.

Obwohl, wie die Abb.15 zeigt, beim Vergleich mit der Kontrollgruppe nach 14 ED 300 Spermien pro 4 cmm mehr, nach 21 ED 450 Spermien pro 4 cmm weniger gezählt wurden, ließ sich für diese Ergebnisse nach der Varianzanalyse keine Signifikanz errechnen. Die maximale Differenz von 800 Spermien pro 4 cmm reicht auf Grund der Streuung innerhalb der Gruppe für einen gesicherten Unterschied nicht aus (Abb.16).

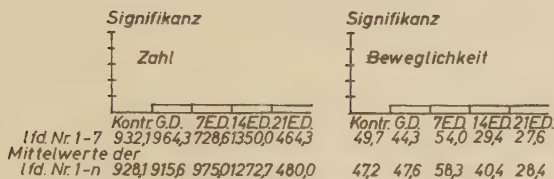


Abb.16 Darstellung der Signifikanzen für die Mittelwerte von Zahl und Beweglichkeit

) Beweglichkeit

Bei allen der 47 überlebenden Kröten konnte nach Auslösung der Speratorrhoe die Beweglichkeit der Samenzellen beurteilt werden. Auf Grund des größeren prozentualen Anteils der unreifen Spermien liegt die Beweglichkeit in der Kontrollreihe etwas unter den Werten der Versuche und der anderen Kontrollgruppen. Die Werte sind nicht deutlich different hinsichtlich statistischer Berechnungen. Die Mittelwerte der lfd.Nr. 1-n liegen bis auf den der 21 ED im Bereich der Kontrollgruppe. Die Abb.15 läßt mit steigender Anzahl der Einzelwerte ein Absinken der prozentualen Anteile der Beweglichkeit erkennen. Von der Gruppe mit 7 ED bis zu den Kröten mit 21 ED haben sich die beweglichen Spermien um mehr als die Hälfte verringert. Die Ursache sehen wir in der Zunahme der vorwiegend unbeweglichen, unreifen Keimzellen. Laut einfacher Varianzanalyse ergeben sich keine Signifikanzen.

In dieser Versuchsserie sind regelmäßig die pH-Werte des Kloakeninhaltes gemessen worden. Im Durchschnitt liegen die prozentualen Anteile der Beweglichkeit bei einem pH-Wert von 6 höher als bei zunehmender Wasserstoffionenkonzentration.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

1. Gegenüberstellung der einzelnen Cytostatica in ihrer Einwirkung auf die Spermatogenese

Diese Gegenüberstellung erlaubte uns, die doppelte Varianzanalyse mit Wiederholungen in Anwendung zu bringen. Hierbei wurden die Ergebnisse nach Applikation und Medikament geordnet. Diese beiden Faktoren können sich in Form einer Wechselwirkung gegenseitig beeinflussen. Über die Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung gibt die doppelte Varianzanalyse Auskunft.

A) Morphologisch normale Spermien

Beim Vergleich des Zahlenmaterials für das morphologische Kriterium der Spermien betrachten wir zunächst die nicht pathologischen Formen nach WILLIAMS, also die Gruppe der ausgereiften Spermien.

Es sei hier nochmals darauf hingewiesen, daß beim statistischen Vergleich der Cytostatica in

der Morphologie das Ergebnis des Versuchspräparates Bayer DG428 nicht berücksichtigt werden kann. Der Grund besteht darin, daß die Zahlen der Kontrollreihen signifikant unterschiedlich sind von den Zahlen der Kontrollreihen der Toxizitätsprüfung von ENDOXAN^(R), E39 sol.^(R) und TRENIMON^(R).

Der orthogonale Vergleich der Zahlen, die aus den Summen von 4x7 Einzelwerten der Gruppen GD,7,14 und 21 ED gebildet werden, ergibt eine Signifikanz zwischen E39 sol.^(R) und TRENIMON^(R) ...^{xxx}, sowie E39 sol.^(R) und ENDOXAN^(R) ...^{xxx}. Die Werte von TRENIMON^(R) und ENDOXAN^(R)

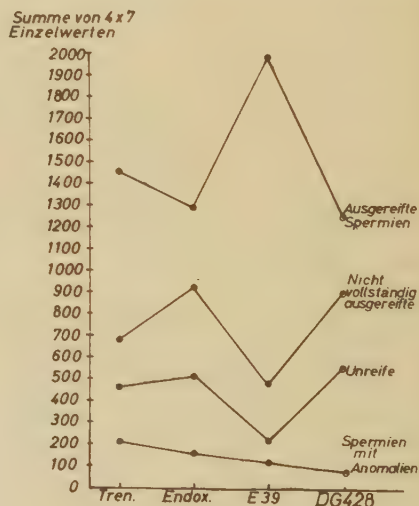


Abb.17 Der Einfluß der vier Cytostatica auf die Morphologie der Keimzellen

sind nicht deutlich verschieden (Abb.17 und 18). Der Wert von DG 428 würde dem von ENDOXAN^(R) entsprechen.

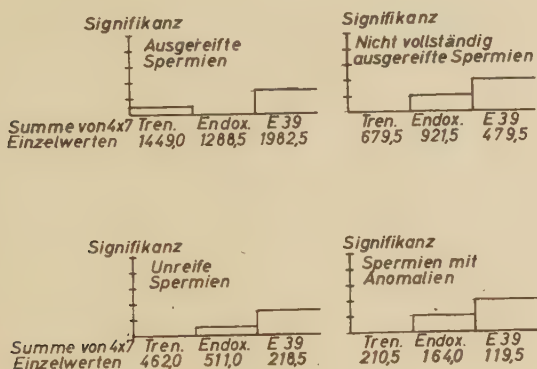


Abb.18 Darstellung der Signifikanzen in der Morphologie zwischen drei Cytostatica

Wir können also feststellen, daß E39 sol.^(R) die Spermien wesentlich geringer an ihrer Ausreifung hemmt als die anderen Substanzen.

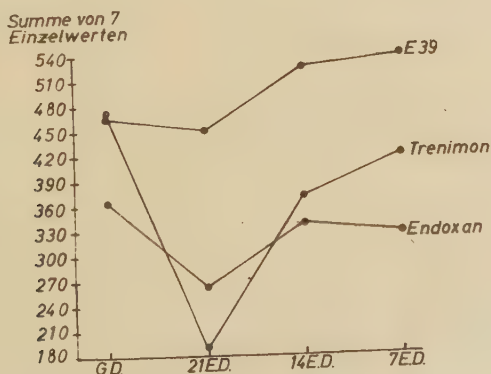


Abb.19 Ausgereifte Spermien. Keine Wechselwirkung zwischen Medikamenten und Dosierungen

Betrachtet man die Wirkung der drei Cytostatica TRENIMON^(R), ENDOXAN^(R), E39 sol.^(R) in der Gesamtaussage der Varianzanalyse, so besteht zwischen den Dosierungen kein signifikanter Unterschied (Abb.19). Wie wir bei der Besprechung der einzelnen Substanzen sahen, konnten wir bis auf E 39 sol.^(R) zwischen den Dosierungen mindestens eine Signifikanz erheben. Statistisch gesehen ergibt sich für die verschiedenen Dosierungen jedes Cytostatikums ein gesicherter unterschiedliches Ausmaß der Einwirkung; diese gilt jedoch für die unterschiedlichen Dosierungen nicht, wenn wir sie in der Gesamtaussage der Cytostatica betrachten. Wir konnten auch zwischen den Medikamenten und Dosierungen keine Wechselwirkung sichern. Das besagt, daß sich die Einwirkungen der Cytostatica trotz verschieden hoher Dosierung nicht voneinander unterscheiden.

B) Morphologisch veränderte Spermien

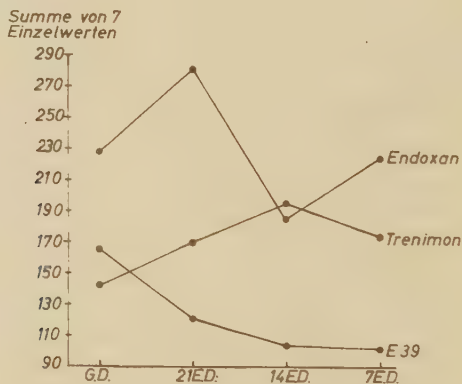


Abb.20 Nicht vollständig ausgereifte Spermien.
Keine Wechselwirkung zwischen Medikamenten und Dosierungen

a) Nicht vollständig ausgereifte Spermien

Die nicht vollständig ausgereiften Spermien gehören nach WILLIAMS zu den pathologischen Formen des Samens. Als Maßstab für die Einwirkung der Medikamente sind sie ungeeignet, da sie an der Grenze zu den nicht pathologischen Formen liegen. Faßt man ausgereifte und nicht ganz ausgereifte Spermien zusammen, so ergeben sich für

Die einzelnen Cytostatica dicht zusammenliegende Summen, deren Unterschied sich wahrscheinlich nicht sichern ließe.

Der orthogonale Vergleich zeigt bei den nicht ganz Ausgereiften gesicherte Unterschiede zwischen ENDOXAN^(R) und E39 sol.^(R) ...^{xxx} sowie ENDOXAN^(R) und TRENIMON^(R) ...^{xx}. Auffällig ist der Unterschied zwischen TRENIMON^(R) und E39 sol.^(R) ...^x (Abb.20). Der Wert von DG428^(R) entspricht dem des B518 (Endoxan), bei dem wir den höchsten Wert feststellen. Auch bei diesem morphologischen Hauptkriterium ließ sich in der Varianzanalyse bei der Gesamtaussage zwischen den Dosierungen kein Unterschied sichern (Abb.20). Eine Wechselwirkung zwischen Dosierungen und Medikamenten besteht nicht.

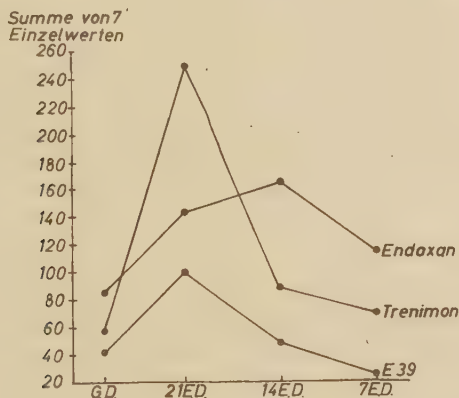


Abb.21 Unreife Spermien. Keine Wechselwirkung zwischen Medikamenten und Dosierungen

b) Unreife Spermien

Die Gesamtsummen aus Prozentzahlen unreifer Spermien (Abb.17) ergeben umgerechnet für TRENIMON^(R) 924=16,5%, für ENDOXAN^(R) 1022=18,3%, für E39 sol.^(R) 437=7,8% und für DG428^(R) 1134=20,3% unreifer Spermien auf jeweils 5600 ausgewertete Keimzellen. Auf 5600 Spermien der Kontrollreihen aller vier Cytostatica kommen 342=6,1% unreife Spermien. Die Prozentsätze sind als Gradmesser der Ausreifungshemmung durch die Cytostatica geeignet.

Wir erkennen, daß E39 sol.^(R) die Ausreifung der Keimzellen kaum

beeinflusst, die anderen drei Cytostatica dagegen hemmen die Ausreifung um mehr als das Dreifache.

Vergleichen wir die Ergebnisse in der Morphologie mit einem Blutausstrich, so können wir auch hier im Spermiogramm bei TRENIMON^(R) ENDOXAN^(R) und DG428 von einer Linksverschiebung sprechen.

Bei der Berechnung der Signifikanz zwischen den Ergebnissen der cytostatischen Einwirkung konnte, wie schon erwähnt, DG428^(R) nicht berücksichtigt werden. Gesicherte Unterschiede errechneten wir zwischen E39 sol.^(R) und TRENIMON^(R) ...^{xx}. TRENIMON^(R) und ENDOXAN^(R) bewirken nach dem orthogonalen Vergleich die gleiche Anzahl unreifer Spermien. Für dieses Kriterium der Morphologie ließ sich in der Gesamtaussage zwischen den Dosierungen ein Unterschied mit 99,9% Sicherheit errechnen. Das bedeutet, daß die drei Cytostatica in ihrer Gesamtheit mit 21 ED die meisten und mit 14 ED erheblich weniger Spermien an der Ausreifung hemmen. 7 ED und GD zeigen die gleich schwache Einwirkung auf die Spermatogenese. Für das einzelne Cytostatikum trifft der gesicherte Unterschied zwischen den Dosen jedoch nicht immer zu. Die Ursache dafür kann in der kleinen Anzahl Kröten liegen.

Wir können feststellen, daß mit zunehmender Anzahl der Einzeldosen die Ausreifung der Keimzellen gehemmt wird. Die einmalige Injektion der Gesamtmenge von 21 ED drei Wochen vor der morphologischen Auswertung zeigt keinen Unterschied in der Zahl der unreifen Spermien zu den siebenmaligen, täglichen Injektionen vor der Auswertung (Abb.21). Eine Wechselwirkung, also eine konstante Relation zwischen den Dosierungen bei allen Cytostaticis besteht jedoch nicht.

c) Spermien mit Anomalien und Defekten

In dieser Gruppe sind Spermien mit mehreren Schwänzen und aufgetriebenen unförmigen Köpfen zusammengefaßt. Spermien mit mehreren Schwänzen traten unter den Injektionen nicht vermehrt auf. Sie haben auch an dem Prozentsatz der Spermien mit Anomalien und Defekten nur einen sehr kleinen Anteil, den wir vernachlässigen können.

Das Hauptkontingent dieser Gruppe stellen also die Keimzellen mit

förmigen großen Köpfen dar. Sie werden als Riesenzellen bezeichnet. Diese Riesenzellen sind der Ausdruck für die Störungen des Kern- und Plasmateilungsvorganges. Riesenzellen fanden auch MERKEL und FALCAO (40) an histologischen Hodenschnitten von Meerschweinchen nach kurzfristigen Atophanylgaben, STEINBERGER et al. sowie LEDMAN und DRUTZ (9) an histologischen Hodenschnitten von Ratten nach TEM-Gaben bzw. Colchicin und Röntgenstrahlen. Die Autoren beobachteten Spermatidenriesenzellen, während wir in dem durch Spermatorrhoe gewonnenen Samen zum größten Teil ausgereifte Spermenriesenzellen feststellen konnten.

Die Gesamtsummen (Abb.17) ergeben umgerechnet für TRENIMON^(R) 421=5,5%, für ENDOXAN^(R) 328=5,9%, für E39 sol.^(R) 239=4,3% und für DG428 162=2,9% Spermien mit Anomalien und Defekten auf jeweils 100 ausgewerteten Spermien. In den Kontrollreihen finden wir 3,0% auf 5600 Spermien. Die Zahlen lassen erkennen, daß das als Antitabakolit wirksame Versuchspräparat DG428 keine Auswirkungen bezüglich dieses morphologischen Kriteriums hat. Geringen Einfluß hat E39 sol.^(R). Doppelt so viele Keimzellen mit unförmigen Köpfen entstehen durch die Einwirkung von ENDOXAN^(R) und TRENIMON^(R).

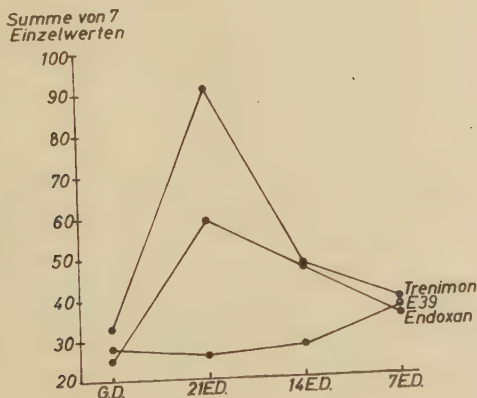


Abb.22 Spermien mit Anomalien und Defekten. Auffällige Wechselwirkung zwischen Medikamenten und Dosierungen

Die doppelte Varianzanalyse mit Wiederholungen ergibt gesicherte

Unterschiede zwischen den Cytostatica ohne DG428 (Abb.18). Die Wahrscheinlichkeitsgrade betragen zwischen TRENIMON^(R) und ENDOXAN^(R) $\dots^x$ TRENIMON^(R) und E39 sol.^(R) $\dots^{xxx}$ und zwischen ENDOXAN^(R) und E39 sol.^(R) $\dots^x$. Das Ergebnis von DG428 liegt knapp unter dem von E39 sol.^(R). Wir können also feststellen, daß hinsichtlich dieses morphologischen Hauptkriteriums die Wirkungsstärke angefangen bei E39 sol.^(R) über ENDOXAN^(R) zum TRENIMON^(R) signifikant zunimmt. Bei der statistischen Ausrechnung ergab sich in der Gesamtaussage der Varianzanalyse wieder ein gesicherter Unterschied von 99,9% zwischen den Dosierungen. Auch hier haben die 21 Einzeldosen von den vier verschiedenen Dosierungen in der Gesamtaussage die höchsten Prozentzahlen hervorgerufen, die über 14 und 7 ED abfallen. Die Gruppe der Gesamtdosis (GD) zeigt die schwächste Wirkung. Das gilt in etwa gleichem Maße auch speziell für TRENIMON^(R) und ENDOXAN^(R). Bei E39 sol.^(R) dagegen ließ sich keine Signifikanz zwischen den Dosierungen erheben (Abb.22). Wir errechneten eine Wechselwirkung mit $F_{0,05}$ nach der F-Verteilung. Das könnte bedeuten, daß die Ergebnisse durch die Dosierungen von ENDOXAN^(R), TRENIMON^(R) und E39 sol.^(R) in bestimmter Relation zueinander stehen oder anders ausgedrückt, daß die Beeinflussung Dosis-Medikament gering ist. Es ist die Möglichkeit gegeben, daß die Prozentzahl der Spermien mit Anomalien und Defekten in der Reihenfolge GD, 7, 14 und 21 ED bei ENDOXAN^(R) und TRENIMON^(R) zunimmt. Bei E39 sol.^(R) und DG428 ließen sich zwischen den Dosen keine signifikanten Unterschiede errechnen.

C) Zahl

Die Ermittlung der Anzahl Spermien pro cmm hat nach der doppelten Varianzanalyse zu keinem unterschiedlichen Ergebnis geführt (Abb.24). Wir konnten in der Varianzanalyse weder zwischen den Dosierungen in der Gesamtaussage und damit auch speziell innerhalb eines Medikamentes, noch unter den Medikamenten eine Signifikanz errechnen (Abb.23). Demnach würden alle vier Cytostatica in den verabreichten Mengen keine gesicherte Auswirkung hinsichtlich einer Verminderung der Zahl der Spermien haben und mit dem Ergebnis der Kontrollreihen übereinstimmen.

Wie schon früher erwähnt, führen wir die nicht vorhandenen Signifikanzen auf die sehr große Streuung innerhalb der Substanzen zurück (Abb.24). Auffällig ist, daß nach 7 und 14 ED besonders bei DG428

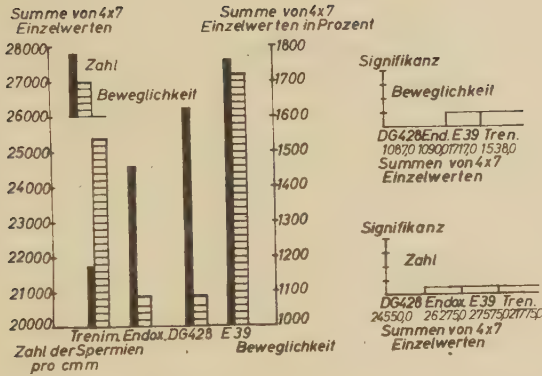


Abb. 23 Abhängigkeit der Zahl und Beweglichkeit von den Cytostaticis. Darstellung der Signifikanzen

Zahl, wenn auch nicht signifikant, jedoch höher liegt als bei Kontrollreihen.

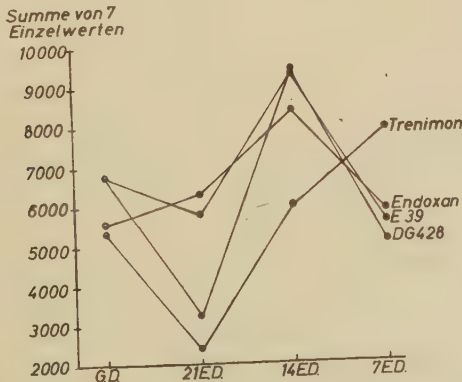


Abb. 24 Abhängigkeit der Zahl von der Dauer der Applikation der Cytostatica. Keine Wechselwirkung

wäre zu prüfen, ob die Substanzen in bestimmter Konzentration einen aktivierenden Einfluß auf teilungsbereite Zellen der Spermatogenese haben, etwa wie Colchicin auf die Schwanzzellen der

Xenophuslarve (36).

Die graphischen Darstellungen (Abb.4 u. 8) zeigen, daß nach TRENIMON^(R) der stärkste Effekt bei 21 ED liegt, nach ENDOXAN^(R) aber bei der Applikation der Gesamtdosis. Das würde in Anlehnung an die DRUCKREYSche Theorie (7) der Endoxan-Wirkung speziell für dieses Präparat ein experimenteller Hinweis sein, in der klinischen Anwendung die Stoßtherapie für die wirkungsvollere Form der Applikation zu halten. Demgegenüber konnte in letzter Zeit GROSS (13) an einem Krankengut von 100 Patienten auf diese Weise noch keine überzeugenden Therapieerfolge feststellen. Unterwirft man die Ergebnisse der Dosierungen von GD und 21 ED bei TRENIMON^(R) und ENDOXAN^(R) dem statistischen Vergleich, so läßt sich in der Varianzanalyse keine Signifikanz ihrer Wirkung nachweisen.

Es sei noch erwähnt, daß bei dem statistischen Vergleich der Anzahl Spermien das Versuchspräparat DG428 mitberücksichtigt werden konnte, da ein Vergleich der Kontrollreihen keinen Unterschied ergab. Eine Wechselwirkung, die durch eine gegenseitige Beeinflussung von Cytostaticis und Dosierungen bedingt sein könnte, besteht ebenfalls nicht.

D) Beweglichkeit

Es wurde schon in dem Kapitel der Vorversuche erwähnt, daß die Beweglichkeit der Keimzellen von dem pH-Wert der Kloakenflüssigkeit abhängig ist. Ein vom pH-Wert unabhängiger orthogonaler Vergleich zwischen den applizierten Substanzen ergibt, daß DG428 und ENDOXAN^(R) gleich stark die Beweglichkeit herabsetzen. Die Zahlen in Abb.23 sind Summen aus 28 Prozentangaben. Die Addition von jeweils 7 Einzelwerten der vier Kontrollreihen ergibt 1485. Ein Vergleich mit E39 sol.^(R) läßt eine nicht geringe Steigerung der Beweglichkeit erkennen. Signifikanzberechnungen gegenüber den Kontrollreihen wurden nicht aufgestellt. Ihre Aussagekraft wird auch dadurch gemindert, daß der Einfluß des pH-Wertes nicht berücksichtigt worden ist.

Bei der doppelten Varianzanalyse mit Wiederholungen wurde in der Gesamtaussage für alle Cytostatica mit 95% Sicherheit ein Unterschied zwischen den Dosierungen errechnet. Daraufhin berechneten

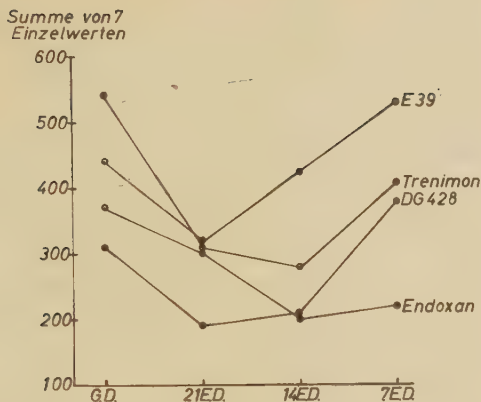


Abb. 25 Abhängigkeit der Beweglichkeit von der Dauer der Applikation der Cytostatica.
Keine Wechselwirkung

wir die Unterschiede für jede einzelne Substanz. Beim orthogonalen Vergleich ließ sich jedoch, wie wir bei der Besprechung der Cytostatica gesehen haben, in keinem Fall ein Unterschied zeigen (Abb. 25). Eine Wechselwirkung konnte nicht gesichert werden.

2. Vergleich mit histologischen Befunden anderer Autoren

Wir haben die Ergebnisse eines Cytostatikums bei den vier verschiedenen Dosierungen besprochen und die vier Cytostatica in ihrem Ausmaß der Einwirkung auf die Spermatogenese bei der Kröte untereinander verglichen. Wir können feststellen, daß die Stärke der Einwirkung mit steigender Anzahl der Einzeldosen zunimmt, was auch Abb. 26 verdeutlicht. Wir konnten ferner zeigen, daß eine einmalige Verabreichung der Substanz von der Menge der 21 ED nach unserer Versuchsanordnung den Auswirkungen der 7 ED im allgemeinen gleichzusetzen ist. Es besteht zwischen Dosis und Wirkung ein Verhältnis, das wir in mehreren Punkten statistisch sichern konnten. Wenn wir die Substanzen in diesem speziellen Verhalten gegeneinander abstufen wollen, dann können wir bei TRENIMON^(R) die größte Einwirkung auf die Spermatogenese beobachten. Es folgen ENDOXAN^(R) und E39 sol.^(R), von dem sich insgesamt eine nur sehr schwache Wirkung gegenüber den Kontrollreihen feststellen läßt.

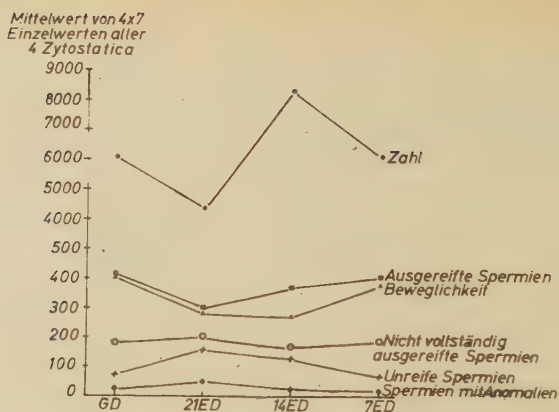


Abb.26 Der Effekt der vier Cytostatica in Abhängigkeit von der Höhe der Dosierung. Eine zusammenfassende Darstellung der untersuchten Kriterien.

In der Morphologie können wir bei den pathologischen Keimzellen einerseits nicht ausgereifte Keimzellen erkennen, zum andern aber auch Spermien mit Kernanomalien. Ein Charakteristikum des Reifungsprozesses ist der Plasmaverlust der Zelle. Wir können nach unseren Befunden bei ENDOXAN^(R), TRENIMON^(R) und E39 sol.^(R) in unterschiedlichem Ausmaß sowohl eine Einwirkung auf die Vorgänge im Kern als auch im Plasma beobachten. Nach Injektion von DG428 scheint die Kern-Plasma-Relation zugunsten des Plasmas verschoben zu sein, was für eine Hemmung der Ausreifung sprechen dürfte. Wir fanden nach Applikation sowohl von DG428 als auch von NaCl-Lösung Kernanomalien in derselben Häufigkeit. Das ist um so auffälliger, da DG428 als Thymin-Derivat ein Antimetabolit ist, und Thymin nur in der DNS gefunden wird. Danach würde man eher sichtbare Kern- als Plasmastörungen erwarten.

Wir sehen also bei allen vier Cytostaticis eine Ausreifungshemmung, die durch das Haftenbleiben von Plasma an den Keimzellen sichtbar wird.

Bei den Antimitotica gibt es nach LEHMANN (27) zwei Wirkungstypen:

Einmal wird die Plasmataätigkeit weitgehend gehemmt, zum andern erfolgt eine Schädigung oder Auflösung des Kernes. Ob das Haftenbleiben des Plasmas bei den nicht ausgereiften Spermien durch eine Hemmung der Plasmataätigkeit hervorgerufen wird, kann nicht morphologisch, sondern in erster Linie biochemisch entschieden werden. Nach unseren Befunden machen sich die Einwirkungen der Cytostatica zuerst durch die Hemmung der Ausdifferenzierung zu reifen Spermien bemerkbar. Später, bei entsprechend langer Behandlung, folgt dann die Aplasie wie mehrere Autoren an Hand von histologischen Hodenschnitten von Meerschweinchen und Ratten nach Atophanyl, TEM, Urethan und N-Lost zeigen konnten (40,55,9,10).

Nach hohen Dosen Colchicin löst sich der Zellverband in den Tubuli der Rattenhoden auf, und alle Stadien der Spermatogenese ergießen sich ins Lumen (51). Wir fanden früheste Stadien der Spermatogenese in der Kloakenflüssigkeit. Sie wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Ihre Zahl war relativ klein, da der größte Teil infolge der Schädigung schnell aufgelöst wird. MERKEL und PALCAO (40) sahen im Nebenhoden von Meerschweinchen nach Atophanylgaben reichlich zugrundegehende, unreife Spermien und deren Vorstufen.

Für die Hodenparenchymschädigung hat v. PALLOS (49) drei Stadien aufgestellt: 1. Reizstadium: Abstoßung unreifer Zellformen ins Lumen, Spermien vereinzelt. 2. Degenerationsstadium: Es erscheinen abnorme Zellformen, Kernzerfallerscheinungen und Riesenzellen. 3. Atrophisches Stadium: Verschwinden von differenzierten Zellformen, nur Sertoli-Zellen und Spermatogonien. Die Zellformen, die wir in der Kloakenflüssigkeit fanden, entsprechen vorwiegend dem Reizstadium und nur zum kleinen Teil dem Degenerationsstadium. Wir können auch daraus schließen, daß die schwer geschädigten Zellen auf Grund ihrer schnellen Auflösung in nur geringer Zahl zur Spermatorrhoe gelangen. Diese Aussage wird unterstützt durch die Tatsache, daß wir zwar alle Zellformen in der Kloakenflüssigkeit sahen, die frühen Stadien sowie sichtbar geschädigten Spermien jedoch in einer erheblichen Minderheit waren. Wieweit das für die Nachkommenschaft zum Vorteil gereicht, läßt sich nur schwer beurteilen, da der Grad der Schädigung, der eine Kopulation unmöglich macht, noch nicht genau bestimmt ist.

Fast alle genannten Autoren beobachteten Riesenzellen in den

Tubuli. Es ist bisher nicht eindeutig geklärt worden, ob Riesenzellen entweder durch Fusion von Spermatocyten oder Spermatiden entstehen oder aber von beiden Zellformen gebildet werden können. Nach der Einteilung von LEBLOND und CLERMONT (26) entstehen sie durch Fusion der Kerne von "cap phase spermatids". Bei cytotatischer Plasmahemmung ist Riesenzellbildung auch durch defekte Plasmateilung nach Kernmitose denkbar.

Wir konnten ein Spermium fotografieren, das die Möglichkeit dieser Entstehungsart wahrscheinlich macht: Das Spermium weist drei Schwänze auf, und der Kopf ist so konfiguriert, daß seine Entstehung durch eine nicht vollständige Kernteilung mit ausgebliebener Plasmateilung glaubhaft ist. Es ist denkbar, daß die in Hodenschnitten gesehenen Spermatidenriesenzellen zu mißgebildeten Spermien aus-

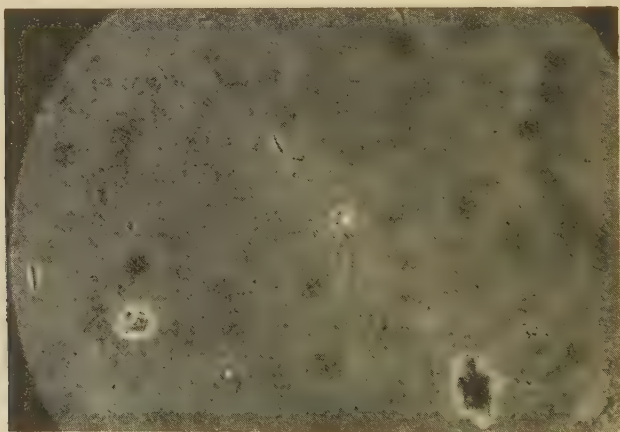


Abb.27 Anomales Spermium mit drei Schwänzen.
Beschreibung siehe Text.

reifen. Diese Spermien weisen aber keinen haploiden Chromosomensatz mehr auf. KLIESCH und SCHMIDTKE (23) fanden in Kaninchensamen nach Colchicin eine durchschnittliche Vergrößerung der Spermienköpfe und polyploide Zellen im Keimepithel. Die Autoren führen die Vergrößerung der Köpfe auf eine Chromatinzunahme zurück. Gelangen diese Keimzellen zur Kopulation, so ist die Möglichkeit der Entstehung polyploider Individuen gegeben.

Eine viel diskutierte Tatsache ist die sichtbare und unsichtbare

Schädigung der Chromosomen durch Strahlen und Cytostatica. Alle cytostatisch wirksamen Substanzen haben sich als Mutagene erwiesen. In der Qualität der durch sie ausgelösten Mutationen können wir sie nach dem derzeitigen Stand der analytischen Methoden weder voneinander noch von den durch Röntgenstrahlen ausgelösten Mutationen unterscheiden (BELITZ (3)). Nach HENKE et al. (16) ist die Mutationsrate in allen Reifungsstadien der Keimzellen von *Drosophila* nach Mitomen^(R) sehr hoch. Große Sensibilität gegenüber mutagenem Einfluß von Antimitotica besteht im Stadium der Meiose (16,34), bei Röntgenstrahlen dagegen erst in späten Spermatidphasen (2,22). Das bedeutet also, daß Spermatiden und Spermien kaum noch beeinflusst werden. Eine ähnliche Beobachtung machten wir, wenn wir an den letzten sieben Tagen 7 ED verabfolgten. Die siebenmalige Dosis vor der Spermienauswertung zeigt kaum einen Einfluß auf die in der Kloakenflüssigkeit gefundenen Keimzellen.

An der Chromosomenschädigung durch cytostatisch wirksame Substanzen und Strahlen ist kein Zweifel. Auf Grund der umfangreichen Exposition des Menschen besteht also eine nicht geringe Gefahr eines Genausfalls bei nachfolgenden Generationen. Besonders gefährdet ist die Menschheit durch rezessive Mutationen, die in nicht geringer Zahl vorhanden sein können. Bei *Drosophila* wurde durch mutagene Stoffe schätzungsweise in jeder Keimzelle eine Mutation induziert (35). LÜERS weist daraufhin, daß sich beim Menschen die Zahl der Aborte und Mißbildungen erhöhen wird. GREENBERG et al. (11) berichten von kongenitalen Mißbildungen, die wahrscheinlich durch Cyclophosphamid hervorgerufen wurden.

Es erhebt sich die Frage, wie lange nach Abschluß der Therapie mit einem Chromosomenschaden der Spermien zu rechnen ist. LÜERS fand bei *Drosophila* nach TEM-Gaben noch nach 30 Tagen eine zehnfach gesteigerte Mutationsrate gegenüber der spontanen Mutabilität (34). Es wird auch die Geschwindigkeit des Spermaverbrauches von Bedeutung sein, um so mehr, als besonders frühe Stadien der Spermatogenese mutativ beeinflusst werden. LÜERS empfiehlt für den Mann eine Wartezeit von mindestens 30 Tagen. Veränderungen an Spermatisiden und Spermien nach Atophanyl waren vielfach regressiv (40). Wenn Versuchstiere steril wurden, konnte entsprechend der verabreichten Menge in den meisten Fällen eine vollständige Regeneration

der Spermatogenese nachgewiesen werden, nach STEINBERGER et al. (55) mit Befruchtungsfähigkeit der Spermien und normalen Nachkommen (40, 9, 10). Kürzlich veröffentlichte MACLEOD (37) in Amerika, daß bei acht Männern, die durch einen Defekt in einem Atomreaktor zum Teil einer Ganz-Körper-Bestrahlung ausgesetzt waren und steril wurden, die Spermiogramme nach spätestens 41 Monaten wieder normal waren. Es besteht also die berechtigte Hoffnung, daß auch die durch cytostatisch wirksame Substanzen hervorgerufene Schädigung der Spermatogenese des Menschen rückbildungsfähig ist, wenn sich die Behandlung nicht über zu lange Zeiträume erstreckt. Der eventuelle genetische Schaden ist irreversibel und kann erst nach Generationen zum Vorschein kommen. Es ist daher dringend erforderlich, Patienten im geschlechtsreifen Alter, die unter Cytostatikum-Behandlung stehen, auf diese speziellen Folgen aufmerksam zu machen. Das betrifft besonders Patienten mit chronischen Tumorerkrankungen der Blutbildungsstätten.

ZUSAMMENFASSUNG

wird die Einwirkung von ENDOXAN^(R), E39 sol.^(R), TRENIMON^(R) auf die in der Erprobung befindlichen Präparate DG428 auf die Spermatogenese der Kröte (*Bufo vulgaris*) untersucht. Zur Beurteilung des cytostatischen Effektes dienen als Kriterien die Morphologie der Keimzellen, ihre Zahl pro cmm Kloakeninhalt und ihre Beweglichkeit.

Mit der Regeneration von Keimzellen unter cytostatischer Einwirkung vor sich geht, wird vor Beginn der Applikation bei den Kröten das Choriogonadotropin eine Spermatorrhoe provoziert. Erst danach wird die zu prüfende Substanz entweder in mehreren Einzeldosen (7, 14, 21 ED) über mehrere Tage oder als Summe der 21 Einzeldosen (GD) einmalig in den dorsalen Lymphsack injiziert. Nach Ablauf der vierwöchigen Versuchsdauer wird eine nochmalige Spermatorrhoe ausgelöst und die im Kloakeninhalt befindlichen Keimzellen werden analysiert.

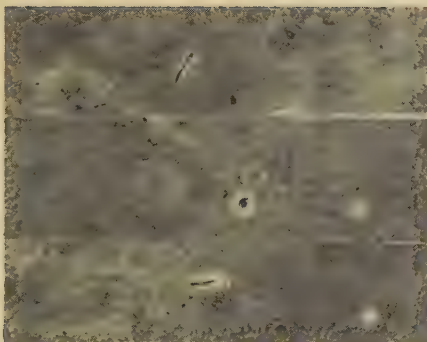
Diese Versuchsanordnung für die einzelnen Kriterien führt zu folgenden, statistisch ausgewerteten Ergebnissen, wobei die Signifikanzberechnung mit Hilfe der Varianzanalyse vorgenommen wird:

In der Morphologie ergibt sich unter der Einwirkung von ENDOXAN^(R) für die ausgereiften, nicht vollständig ausgereiften und unreifen Spermien bei den vier verschiedenen Dosierungsgruppen (7, 14, 21 ED und GD) zwischen den Mittelwerten kein signifikanter Unterschied. Alle vier Dosierungsgruppen sind jedoch gegen den Kontrollwert deutlich verschieden. Bei den defekten Spermien sehen wir eine signifikante Zunahme nach 14 und 21 ED. Unter der Einwirkung von E 39 sol.^(R) zeigen von den vier morphologischen Hauptkriterien nur die unreifen Spermien eine Signifikanz zwischen 21 ED und den anderen drei Dosierungsgruppen sowie der Kontrollgruppe.

Für die ausgereiften Spermien ergibt sich nach TRENIMON^(R) zwischen den Werten der Kontrolle, 14 und 21 ED eine gesicherte, fortlaufende Abnahme und für die unreifen Spermien und Spermien mit Defektbildung eine gesicherte, ständige Zunahme. Bei den nicht vollständig Ausgereiften finden wir keine Signifikanz. Das morphologische Gesamtbild bietet eine deutliche Linksverschiebung. Unter Linksverschiebung ist im Spermigramm eine

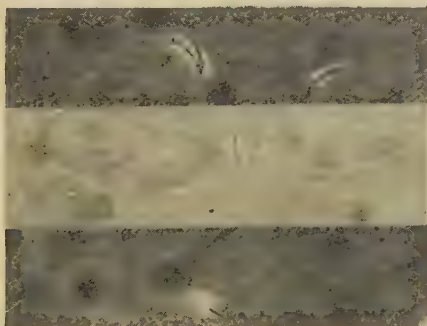
prozentuale Zunahme unreifer Keimzellen zu verstehen.

4. Unter der Einwirkung von DG 428 nehmen die Ausgereiften nach 14 und 21 ED deutlich ab und die unreifen Spermien bei 14 ED gegenüber allen anderen Dosierungsgruppen gesichert zu. Auffallend ist die Konstanz der Mittelwerte bei den defekten Keimzellen.
5. Die Wirkung der Gesamtdosis (GD) ist der Wirkung von 7 ED bei allen vier morphologischen Hauptkriterien und Cytostaticis nach unserer Versuchsanordnung gleichzusetzen. Beide Gruppen sind nur bei ENDOXAN^(R) vom Kontrollwert signifikant verschieden.
6. Bei der Auswertung der Anzahl der Spermien pro cmm Kloakenflüssigkeit und bei der Beurteilung ihrer Beweglichkeit fand sich für die einzelnen Cytostatica untereinander als auch zwischen ihren Dosierungen kein signifikanter Unterschied.
7. Bezüglich der Morphologie zeigt ein Vergleich des Ausmaßes der Einwirkung zwischen ENDOXAN^(R), E 39 sol.^(R) und TRENIMON^(R), daß TRENIMON^(R) die Ausreifung der Keimzellen mehr hemmt als ENDOXAN^(R) und wesentlich stärker als E 39 sol.^(R). Das Versuchspräparat DG 428 kann bei dem Vergleich aus statistischen Gründen nicht berücksichtigt werden.



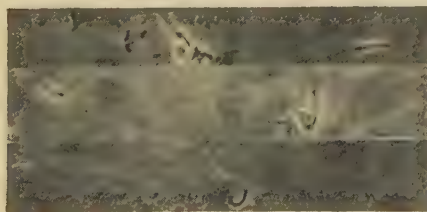
Ausgereifte

Spermien



Nicht vollständig
ausgereifte

Spermien



Unreife Spermien



Spermien mit

Anomalien

und Defekten

Literaturverzeichnis

- 1 Arnold, H.; Bourseaux: Synthese und Abbau zytostatisch wirksamer zyklischer N-Phosphamidester des Bis-(β -chloräthyl)-amin
Angew.Chem. 70, 539-44, 1958
- 2 Auerbach, C.: Sensitivity of the drosophila testis to the mutagenic action of X-rays
Z.indukt.Abstamm.u.Vererb.-Lehre 86, 113, 1954
- 3 Belitz, H.J.: Vererbungsprobleme bei Aquarienfischen
Wissenschaftliche Annalen, Berlin, 2, 570, 1953
- 4 Belonoschkin, E., J.Henze: Wirkung von Sulfonamiden auf Spermatozoen
Zbl.Gynäk. 66, 880, 1942
- 5 Bergner, R.: Untersuchungen zur Methodik der Spermatozoenauszahlung
Zbl.Gynäk. 83, 1978-1983, 1961
- 6 Brock, N., H.-J.Hohorst: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro
Arzneim.-Forsch. 13, 1021-1031, 1963
- 7 Druckrey, H. et al.: Experimentelle Beiträge zum Dosis-Problem in der Krebs-Chemotherapie und zur Wirkungsweise von Endoxan
Dtsch.Med.Wschr. 88, 651-663 und 715-721, 1963
- 8 Druckrey, H., S.Raabe: Organspezifische Chemotherapie des Krebs
Klin.Wschr. 30, 882, 1952
- 9 Friedman, N., B.A.Drutz: Certain effects of irradiation, nitrogen mustard, urethane and colchicine on the testis
Journal of Urology 85, 609-612, 1961
- 10 Goldeck, H., H.Hagenah: Der Stickstoff-Lost-Einfluß auf die Fertilität und Spermiogenese der Laboratoriumsratte
Zeitschr.für die gesamte experimentelle Medizin 117, 467-480, 1951
- 11 Greenberg, L.H. et al.: Congenital anomalies probably induced by cyclophosphamide
Journal Amer.med.Ass. 188, 423, 1964
- 12 Grella, P.: Über den Wirkungsmechanismus von Cyclophosphamid: Hemmung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Arch.It.Pat.Clin.Tum. 6, 131-136, 1963
- 13 Gross, R.: Chemotherapie des Garcinoms. Kurzreferat
Langenbecks Archiv Kongreß 1964 Sonderdruck
- 14 Grundmann, E. et al.: Vergleichende histologische, zytophotometrische und biochemische Untersuchungen über die Wirkung von Endoxan auf das Jensen-Sarkom der Ratte
Klin.Wschr. 38, 546-48, 1960
- 15 Heilmeyer: Anfänge einer Chemotherapie neoplastischer Erkrankungen
Schweiz.med.Wschr. 539, 1949
- 16 Henke, H. et al.: Untersuchungen über die mutagene Wirkung einiger Cytostatica
Zeitschrift für Krebsforschung 62, 347, 1958
- 17 Hilz, H., E.J.Klempien: Über die Einwirkung von cytostatischen Verbindungen auf die Ascites-Tumor-Ribonukleasen
Biochem.Zschr. 331, 563, 1959

- Holzer, H., H. Kröger: Zum Mechanismus der Wirkung von B518 (Endoxan) auf das Jensen-Sarkom und zur Hemmung der Chemotherapie durch das Vitamin Nikotinsäureamid
Klin. Wschr. 36, 677, 1958
- Holzer, H. et al.: Verwertung von Nikotinsäure und Nikotinsäureamid für die Biosynthese von DNA in Ascites-Tumorzellen
Biochem. Biophys. Acta 51, 600, 1961
- Joël, Ch. A.: Studien am menschlichen Sperma
Benno Schwabe Verlag, Basel 1953
- Kessler, F.-J., F.-W. Blumenberg: Experimenteller Beitrag zum Verhalten der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität im Blutserum bei der Chemotherapie bösartiger Tumoren mit Endoxan
Arzneim.-Forsch. 11, 188-190, 1961
- Khishin, A. E. F.: Response of immature testis of *Drosophila* to the mutagenic action of X-rays
Z. indukt. Abstamm.-u. Vererb.-Lehre 87, 97, 1955
- Kliesch, J., C. Schmidtke: Untersuchungen über die Wirkung von Colchicin auf die Spermatogenese beim Kaninchen unter besonderer Berücksichtigung der Polyploidie
Zeitschr. für Tierzüchtung 63, 127, 1954
- Koller, S.: Die Aufgaben der Statistik und Dokumentation in der Medizin
Deutsche med. Wschr. 88, 1917-24, 1963
- Köttgen, H. W., Mth. Wolf: Versuche mit Endoxanthherapie bei kindlichen Tumoren
Med. Klinik 56, 15-18, 1961
- Leblond, C. P., Y. Clermont: Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat
Ann. New York Acad. Sc. 55, 548, 1952
- Lehmann, F. E.: Chemische Beeinflussung der Zellteilung
Experientia 3, 223, 1947
- Lettré: Die Teilung normaler und bösartiger Zellen als biochemisches Problem
Strahlentherapie 83, 1, 1950
- Limburg, H., M. Krahe: Über die Wirkung neuerer Zytostatica auf die Glykolyse menschlicher Genitaltumoren
Krebsforschung und Krebsbekämpfung 494, 1961
- Liss, E., G. Palme: Die Hemmung des Einbaues von ^{32}P in die DNS durch Endoxan
Naturwiss. 50, 336, 1963
- Lits, F. J.: Contribution à l'étude des réactions cellulaires provoquées par la Colchicine
Comptes rendus des séances de la Société de Biologie et ses filiales T. 115, 1421, 1934
- Löhr, G. W.: Beitrag zum Wirkungsmechanismus des zyklischen N-⁶-Phosphamidesters Endoxan auf den Tumorstoffwechsel Chemotherapie maligner Tumoren. 2. Bielefelder Symposium. Herausgeber: H. Wilmanns, Stuttgart 1960
- Löhr, G. W.: Vergleichende Untersuchungen über die Hemmung der Phosphoglyceraldehyddehydrogenase durch verschiedene zytostatische Substanzen
Klin. Wschr. 35, 1163-66, 1957

- 34 Lüers, H.: Zur Frage der Erbschädigung durch tumortherapeutische Cytostatica
Zeitschrift für Krebsforschung 60, 528, 1955
- 35 Lüers, H.: Genetische Spätschäden nach Behandlung mit zytostatischen Stoffen
Neunte Österreichische Ärztetagung Salzburg, Sept. 1955, Springer Verlag, Wien, 1956
- 36 Lüscher, M.: Wirkung von Colchicin auf die Schwanzzellen der Xenopuslarve
Rev. suisse Zool. 53, 683, 1946
- 37 MacLeod, J. et al.: Male fertility after sterilization by nuclear radiation
Journal Amer. Med. Ass. 187, 637, 1964
- 38 Manstein, B., F. Schmidt-Hoensdorf: Eine einfache Schwangerschaftsreaktion mit der einheimischen Erdkröte (*Bufo vulgaris*)
Ärztl. Forschung 4, 53-55, 1949
- 39 Marquardt, F.: Die Untersuchung der Zeugungsfähigkeit des Mannes
Geburtshilfe und Frauenheilkunde 1, 326-331, 1939
- 40 Merkel, H., J. Falcao: Hodenschädigung durch Atophanyl beim Versuchstier
Frankfurter Zeitschr. für Pathologie 66, 68-76, 1955
- 41 Naumann, W.: Der Froschtest als biologische Schwangerschaftsdiagnose im Vergleich mit dem Ratten- und Mäusetest
Diss. Mainz 1951
- 42 v. Pallos: Die Wirkung der synthetischen oestrogenen Stoffe auf die Geschlechtsorgane und die innersekretorischen Drüsen
Arch. Gynäk. 170, 355, 1940
- 43 Palme, G. et al.: Der Einfluß von Cyclophosphamid auf die Desoxyribonukleinsäure-Synthese von normalen proliferierenden Zellen sowie Ascites-Tumorzellen
Arzneim. Forsch. 13, 1034-1039, 1963
- 44 Pfanzagl, J.: Allgemeine Methodenlehre der Statistik II
Sammlung Göschen, De Gruyter Verlag, Berlin, 1962
- 45 Preussmann, R.: Chlorabspaltbarkeit und Wirksamkeit von N-Lost-Verbindungen
Arzneim. Forsch. 8, 9, 1958
- 46 Preussmann, R.: Chlorabspaltbarkeit und Wirksamkeit bei N-Lost-Verbindungen
Arzneim. Forsch. 12, 1119, 1962
- 47 Rathgen, G. H., W. Humke: Die Desoxyribonuklease-Aktivität in einigen Rattenorganen nach Behandlung mit zytostatisch wirkenden Substanzen
Naturwiss. 50, 128, 1963
- 48 Rathgen, G. H., W. Humke, H. Heinrichs: Zum Wirkungsmechanismus zytostatischer Substanzen
Chemotherapie 7, 33-47, 1963
- 49 Röhrborn, G.: Mutagene Wirkung von alkylierenden Substanzen
Chemotherapie maligner Tumoren. 3. Bielefelder Symposium 14. und 15. Nov. 1962 Herausgeber Doz. Dr. H. Wilmanns
- 50 Roitt, J. M.: The inhibition of carbohydrate metabolism in ascites tumor cells by ethylenimines
Biochem. J. 63, 300, 1956
- 51 Roosen-Runge, E.: Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat
Journal of Anatomy 88, 163, 1951

- 2 Schmidt, W.: Anlage und statistische Auswertung von Untersuchungen
Verlag Schaper, Hannover 1961
- 5 Schnieders, L., H. Kersten: Das "Ribonukleinsäure-Desoxy-ribonuklease-System" in Bakterien
Vortrag: Gemeins. Tagung d. deutschen, schweizerischen und französischen Biochemiker, Strassburg, September 1963
- 4 Spitz, S.: Histological effects of Nitrogen Mustards
Cancer 2, 383, 1948
- 5 Steinberger et al.: A radiometric effect of Triethylenemelamine on reproduction in the male rat
Endocrinology 65, 40-50, 1959
- 6 Westphal, K., R. Bierling: Über Pyrimidine mit cytostatischer Wirkung
Die Naturwissenschaften 46, 1959
- 7 Williams, W. W.: Cytology of the Human Spermatozoon
Fertility and Sterility 1, 199, 1950

Herrn Priv.-Doz. Dr. W. H u m k e, Oberarzt der Universitäts-Frauenklinik Mainz, möchte ich für die Überlassung des Themas und ganz besonders für die stets freundliche und gefällige Unterstützung danken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Sr. Spektabilität, Herrn Professor Dr. K. T h o m s e n, dem Direktor der Universitäts-Frauenklinik Mainz, für den mir an seiner Klinik zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und für die Übernahme des Korreferates ergebenst bedanken.

Ebenfalls bin ich Herrn Priv.-Doz. Dr. G. R a t h g e n für die Anregungen bei der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Die statistischen Berechnungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. med. D u d e c k (Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation der Universität Mainz, Direktor: Prof. Dr. Dr. S. K o l l e r) durchgeführt, wofür ihm an dieser Stelle herzlich gedankt sei.

Lebenslauf

Am 15. Mai 1939 wurde ich, Ingo R e i n e m a n n , als erstes Kind des Oberingenieurs Wilhelm Reinemann und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Reckermann, in Dortmund geboren.

Ostern 1946 bin ich in die Volksschule zu Dortmund-Brackel eingeschult worden und am 10. März 1960 legte ich an dem Stadt-Gymnasium in Dortmund die Reifeprüfung ab.

Seitdem studiere ich an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz Medizin. Am 3. August 1962 bestand ich in Mainz das Physikum. Jetzt bin ich im 10. Semester und beabsichtige im kommenden Sommer das medizinische Staatsexamen zu machen.

Xerografie - Druck
Chemoprint^{OHG}
Gießen